

日本国特許庁
JAPAN PATENT OFFICE

PCT/JP03/04884

17.04.03

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office

出願年月日

Date of Application:

2002年 4月17日

出願番号

Application Number:

特願2002-115529

[ST.10/C]:

[JP2002-115529]

出願人

Applicant(s):

大正製薬株式会社

REC'D 13 JUN 2003

WIPO

PCT

BEST AVAILABLE COPY

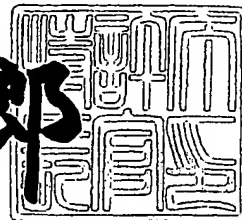
PRIORITY
DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2003年 5月27日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

太田信一郎



出証番号 出証特2003-3038850

【書類名】 特許願
【整理番号】 00TS-P3320
【あて先】 特許庁長官殿
【発明者】

【住所又は居所】 東京都豊島区高田3丁目24番1号 大正製薬株式会社
内

【氏名】 池田 明子

【発明者】

【住所又は居所】 東京都豊島区高田3丁目24番1号 大正製薬株式会社
内

【氏名】 篠永 英樹

【発明者】

【住所又は居所】 東京都豊島区高田3丁目24番1号 大正製薬株式会社
内

【氏名】 藤本 奈津子

【発明者】

【住所又は居所】 東京都豊島区高田3丁目24番1号 大正製薬株式会社
内

【氏名】 葛西 陽子

【特許出願人】

【識別番号】 000002819

【氏名又は名称】 大正製薬株式会社

【代表者】 上原 明

【代理人】

【識別番号】 100074114

【弁理士】

【氏名又は名称】 北川 富造

【電話番号】 03-3985-1111

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 003551

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9703058

【ブルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 育毛剤

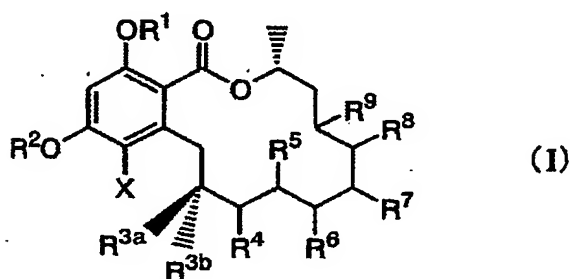
【特許請求の範囲】

【請求項 1】 WNT-5A の機能阻害活性を有する化合物を含有する毛乳頭細胞増殖促進剤。

【請求項 2】 WNT-5A の機能を阻害する化合物が WNT-5A 産生抑制剤である、請求項 1 に記載の毛乳頭細胞増殖促進剤。

【請求項 3】 式 (I)

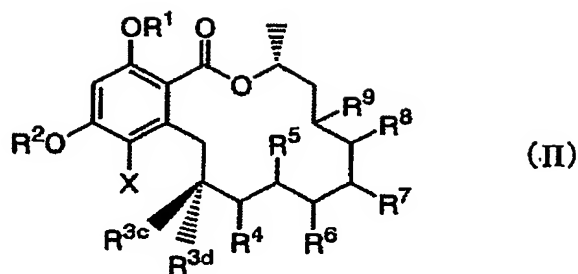
【化 1】



(式中、 R^1 及び R^2 は 同一又は異なって水素原子、 C_{1-6} アルキル基又は C_{2-6} アルカノイル基を示し、 X は水素原子又はハロゲン原子を示し、 R^{3a} 及び R^{3b} は水素原子又は水酸基を示し、 R^{3a} が水素原子の場合 R^{3b} は水酸基であり、 R^{3a} が水酸基の場合 R^{3b} は水素原子であり、 R^4 、 R^5 、 R^6 、 R^7 、 R^8 及び R^9 は同一又は異なって水素原子、水酸基、ハロゲン原子、 C_{2-6} アルカノイルオキシ基を示すか、又は隣り合う基が一緒になってパイ結合又はエーテル結合を形成するか、又は R^5 と R^8 もしくは R^5 と R^9 が一緒になってエーテル結合を形成する。) で表される化合物。

【請求項 4】 式 (II)

【化 2】



(式中、 R^1 及び R^2 は 同一又は異なって水素原子、 C_{1-6} アルキル基又は C_{2-6} アルカノイル基を示し、 X は水素原子又はハロゲン原子を示し、 R^{3c} 及び R^{3d} は 同一又は異なって水素原子、水酸基又は C_{1-6} アルコキシ基を示すか、又は R^{3c} 及び R^{3d} が一緒になってオキソ基、ヒドロキシイミノ基又は C_{1-6} アルコキシイミノ基を形成し、 R^4 、 R^5 、 R^6 、 R^7 、 R^8 及び R^9 は同一又は異なって水素原子、水酸基、ハロゲン原子、 C_{2-6} アルカノイルオキシ基を示すか、又は隣り合う基が一緒になってパイ結合又はエーテル結合を形成するか、又は R^5 と R^8 もしくは R^5 と R^9 が一緒になってエーテル結合を形成する。) で表される化合物を含有する毛乳頭細胞増殖促進剤。

【請求項 5】 請求項 1、2 又は 4 に記載の毛乳頭細胞増殖促進剤を有効成分とする発毛剤又は育毛剤。

【請求項 6】 WNT-5A の機能を阻害する化合物を選択することを特徴とする、毛乳頭細胞増殖促進剤のスクリーニング方法。

【請求項 7】 下記 (a) 乃至 (c) の工程を含むことを特徴とする請求項 6 記載の方法。

(a) ヒト WNT-5A 発現細胞を化合物を添加した培地を用いて培養する工程：

(b) 工程 (a) で培養したヒト WNT-5A 発現細胞を溶解して RNA を抽出し、WNT-5A mRNA 量を測定する工程：及び

(c) 工程 (b) で測定した WNT-5A mRNA 量を比較する工程。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、毛乳頭細胞増殖促進剤、発毛剤及び育毛剤に関するものである。具体的には、WNT-5Aの機能阻害物質を有効成分とする毛乳頭細胞増殖促進剤、発毛剤及び育毛剤に関するものである。また、WNT-5A機能阻害作用に基づく毛乳頭細胞増殖促進剤のスクリーニング方法に関するものである。

【0002】

【従来の技術】

ヒト毛髪毛包は、角化細胞、毛乳頭細胞、繊維芽細胞、及び脂腺細胞等の様々な上皮系及び真皮間様系の細胞から構成されており、これらの細胞間相互作用を介して、毛髪の成長サイクル（毛周期）が調節されている。毛の本体は、毛包角化細胞の増殖／分化（角化）により形成されるが、この毛包角化細胞の増殖、分化、及びアポトーシスを制御し、毛周期調節の中心的な役割を担っているのは、毛乳頭である。したがって、発毛剤／育毛剤を開発する上で毛乳頭細胞に対する作用を研究することは重要と考えられる。しかし、これまでに毛乳頭細胞の増殖能及び毛周期調節能を制御する分子機構についてはほとんど明らかにされていない。

【0003】

一方、WNT-5AはWNTファミリーに属する分泌性糖蛋白質である。WNTファミリーには、約20種類の分子が存在し、各分子は線虫から哺乳類まで広く保存されている。これらWNTsは、胎生期の体軸形成や器官形成を制御している重要な細胞間シグナル分子であることが知られている（Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 14, 59-88 (1998)、Genes&Dev. 11, 3286-3305 (1997)）。WNTsの受容体は、7回膜貫通型のFrizzledで、ヒトでは10種類が存在する（Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 14, 59-88 (1998)、Genes&Dev. 11, 3286-3305 (1997)）。WNTとFrizzledの結合の組み合わせに依存して、3種類のシグナル伝達経路（WNT/ β -カテニン経路、PCP経路、WNT/ Ca^{2+} 経路）が存在する（Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 14, 59-88 (1998)）。

【0004】

アフリカツメガエルWNT-5A mRNA をヒトFrizzled5 mRNAとともにアフリカツメガエル初期胚に注入すると、2次体軸が誘導される。一方で逆にWNT-1やWNT-8

mRNAの注入により誘導される二次体軸形成をWNT-5Aが抑制することも報告されている (J.Cell Biol.133,1123-1137(1996))。また、アフリカツメガエルWNT-5Aは、ラットFrizzled2と結合し、 Ca^{2+} 経路を介してCamKII (Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II) とPKC (protein kinase II) が活性化されることが示されているが (Dev. Biol. 182, 114-120 (1997)、Curr. Biol. 9, 695-698 (1999))、生理的な意味が解明されておらず、WNT-5Aと発毛/育毛との関連性については何ら報告はない。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、毛乳頭細胞の増殖を制御する分子を用いたスクリーニング方法、毛乳頭細胞増殖促進剤並びに新規な作用に基づく発毛剤又は育毛剤を提供することを目的とする。

【0006】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは鋭意研究の結果、毛乳頭細胞にWNT-5Aが高発現していること、WNT-5Aが毛乳頭細胞の増殖能に関与することを発見した。さらにこの知見に基づき検討を重ねた結果、WNT-5Aの機能を阻害することにより毛乳頭細胞の増殖を顕著に促進することを見出し、本発明を完成するに至った。

【0007】

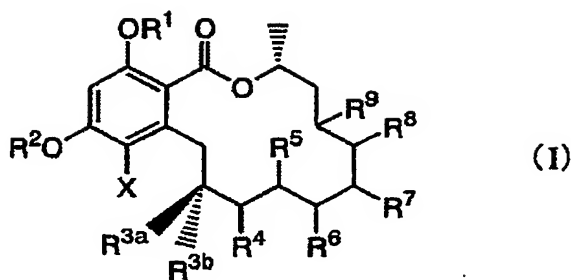
すなわち、本発明は、WNT-5Aの機能阻害活性を有する化合物を含有する毛乳頭細胞増殖促進剤である。

また、本発明は、WNT-5A産生抑制作用を有する化合物を含有する毛乳頭細胞増殖促進剤である。

また、本発明は、式 (I)

【0008】

【化3】



【0009】

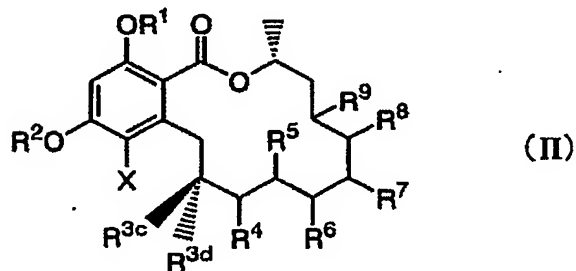
(式中、 R^1 及び R^2 は 同一又は異なって水素原子、 C_{1-6} アルキル基又は C_{2-6} アルカノイル基を示し、Xは水素原子又はハロゲン原子を示し、 R^{3a} 及び R^{3b} は水素原子又は水酸基を示し、 R^{3a} が水素原子の場合 R^{3b} は水酸基であり、 R^{3a} が水酸基の場合 R^{3b} は水素原子であり、 R^4 、 R^5 、 R^6 、 R^7 、 R^8 及び R^9 は同一又は異なって水素原子、水酸基、ハロゲン原子、 C_{2-6} アルカノイルオキシ基を示すか、又は隣り合う基が一緒になってパイ結合又はエーテル結合を形成するか、又は R^5 と R^8 もしくは R^5 と R^9 が一緒になってエーテル結合を形成する。)で表される化合物である。

【0010】

また、本発明は、式 (II)

【0011】

【化4】



【0012】

(式中、 R^1 及び R^2 は 同一又は異なって水素原子、 C_{1-6} アルキル基又は C_{2-6} アルカノイル基を示し、Xは水素原子又はハロゲン原子を示し、 R^{3a} 及び R^{3b} は

同一又は異なって水素原子、水酸基又は C_{1-6} アルコキシ基を示すか、又は R^{3c} 及び R^{3d} が一緒になってオキシ基、ヒドロキシイミノ基又は C_{1-6} アルコキシイミノ基を形成し、 R^4 、 R^5 、 R^6 、 R^7 、 R^8 及び R^9 は同一又は異なって水素原子、水酸基、ハロゲン原子、 C_{2-6} アルカノイルオキシ基を示すか、又は隣り合う基が一緒になってパイ結合又はエーテル結合を形成するか、又は R^5 と R^8 もしくは R^5 と R^9 が一緒になってエーテル結合を形成する。)で表される化合物を含有する毛乳頭細胞増殖促進剤である。

また、本発明は、上記毛乳頭細胞増殖促進剤を有効成分とする発毛剤である。

また、本発明は、WNT-5Aの機能を阻害する物質を選択することを特徴とする、毛乳頭細胞増殖促進剤のスクリーニング方法である。

また、本発明は、WNT-5Aの機能を阻害する物質を選択する方法であって、下記(a)乃至(c)の工程を含むことを特徴とする毛乳頭細胞増殖促進剤のスクリーニング方法である。

(a) ヒトWNT-5A発現細胞を化合物を添加した培地を用いて培養する工程：

(b) 工程(a)で培養したヒトWNT-5A発現細胞を溶解してRNAを抽出し、WNT-5A mRNA量を測定する工程：及び

(c) 工程(b)で測定したWNT-5A mRNA量を比較する工程。

【0013】

【発明の実施の形態】

以下、本発明を更に具体的に説明する。

【0014】

＜WNT-5Aの機能を阻害する化合物＞

本発明において「WNT-5Aの機能を阻害する化合物」（以下、「WNT-5A機能阻害剤」ということがある。）とは、WNT-5AとWNT-5A受容体の結合を阻害する化合物、又は、WNT-5Aの産生を抑制する化合物を意味し、好ましくはWNT-5Aの産生を抑制する化合物である。

【0015】

WNT-5Aは、ヒト、マウス、ラット、アフリカツメガエル等でその発現が確認されているWNTファミリーに属する分泌性糖蛋白質であるが、医薬品として使用す

る点からヒトのWNT-5A（配列番号1）機能を阻害する化合物が好ましい。

【0016】

WNT-5AとWNT-5A受容体の結合を阻害する化合物とは、WNT-5A又はWNT-5A受容体に作用することによりWNT-5AとWNT-5A受容体の結合を阻害し、WNT-5Aによるシグナル伝達を抑制するものを意味し、好ましくは Ca^{2+} 経路を介したシグナル伝達を抑制する化合物であり、例えば、WNT-5A受容体アンタゴニストを挙げることができる。WNT-5A受容体としては、具体的には例えば、ヒトFrizzled5（配列番号4）、ラットFrizzled2（配列番号6）を挙げることができる。当該化合物は、ペプチド性でも非ペプチド性でもよいが、作用時間が長い利点がある非ペプチド性の阻害剤が好ましい。また、当該化合物は、標識したWNT-5A及びWNT-5A受容体を用いたスクリーニング系により選択することができ、好ましくはIC50が $10\mu\text{g/ml}$ 以下のものである。

【0017】

WNT-5A産生を抑制する化合物とは、WNT-5A遺伝子の発現を抑制する化合物を意味する。当該化合物は、ペプチド性でも非ペプチド性でもよいが、作用時間が長い利点がある非ペプチド性の阻害剤が好ましい。また、当該化合物は、WNT-5A蛋白質量（配列番号1）又は指標WNT-5A mRNA量（配列番号2）の減少を指標として選択することができ、好ましくはHartleyらの方法（DRUG METABOLISM AND DISPOSITION 28(5), 608-616 (2000)）に準じた核酸プローブアッセイ方法によりIC50が $10\mu\text{g/ml}$ 以下のものである。更に好ましくは、式（II）で表される化合物である。

【0018】

式（II）で表される化合物において C_{1-6} アルキル基とは、炭素数1～6の直鎖又は分枝鎖状のアルキル基を意味し、具体的には、例えばメチル基、エチル基、プロピル基、イソプロピル基、ブチル基、イソブチル基、tert-ブチル基、ペンチル基、2-エチルプロピル基、ヘキシル基等が挙げられる。

【0019】

C_{2-6} アルカノイル基とは、炭素数2～6の直鎖又は分枝鎖状のアルカノイル基を意味し、具体的には、例えばアセチル基、プロピオニル基、ブチリル基、t

ーブチリル基などである。

【0020】

C₁₋₆アルコキシ基とは、炭素数1～6の直鎖又は分枝鎖状のアルコキシ基を意味し、具体的には、例えばメトキシ基、エトキシ基、プロポキシ基、イソプロポキシ基、ブトキシ基、イソブトキシ基、sec-ブトキシ基、tert-ブトキシ基、ペンチロキシ基、イソペンチロキシ基、ネオペンチロキシ基、tert-ペンチロキシ基、1-メチルブトキシ基、2-メチルブトキシ基、1,2-ジメチルプロポキシ基、ヘキシロキシ基、イソヘキシロキシ基等が挙げられる。

【0021】

C₁₋₆アルコキシイミノ基とは、炭素数1～6の直鎖又は分枝鎖状のアルコキシイミノ基を意味し、具体的には、例えばN-メトキシイミノ基、N-エトキシイミノ基、N-プロポキシイミノ基、N-イソプロポキシイミノ基、N-ブトキシイミノ基、N-イソブトキシイミノ基、N-ペンチロキシイミノ基、N-ヘキシロキシイミノ基等が挙げられる。

【0022】

C₂₋₆アルカノイルオキシ基とは、炭素数2～6の直鎖又は分枝鎖状のアルカノイルオキシ基を意味し、具体的には、例えばアセトキシ基、プロピオニルオキシ基、ピバロイルオキシ基等が挙げられる。

【0023】

エーテル結合とは、-O-、式-(CH₂)_m-O-(CH₂)_n-（式中、m及びnはそれぞれ1～3の整数を表し、式中のアルキレン基はアルキル基で置換されていてもよい。）又は、式-O-(CH₂)_m-O-（式中、mは1～3の整数を表し、式中のアルキレン基はアルキル基で置換されていてもよい。）を意味する。

【0024】

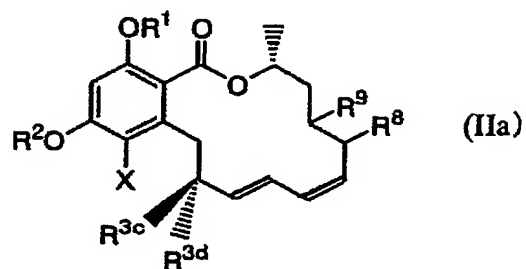
パイ結合又はエーテル結合を形成する隣り合う基の組み合わせとしては、(R⁴とR⁵)、(R⁵とR⁶)、(R⁶とR⁷)、(R⁷とR⁸)及び(R⁸とR⁹)を挙げることができる。

式(II)で表される化合物の中でより好ましくは式(I)で表される化合物であり、更に好ましくはR^{3a}が水素原子であり、R^{3b}は水酸基である化合物である。

また、式(IIa)、式(IIb)、式(IIc)で表される化合物が好ましい。

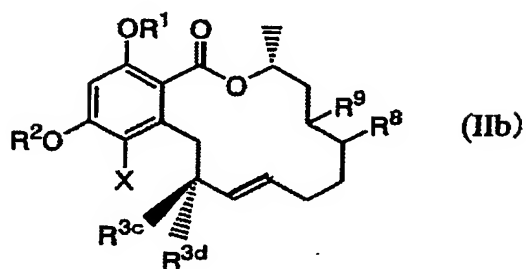
【0025】

【化5】



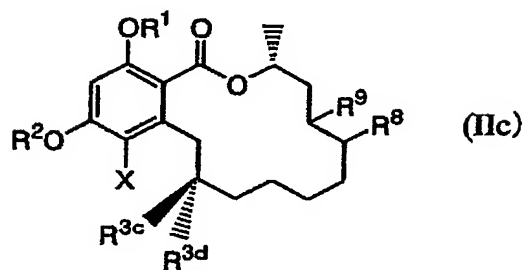
【0026】

【化6】



【0027】

【化7】



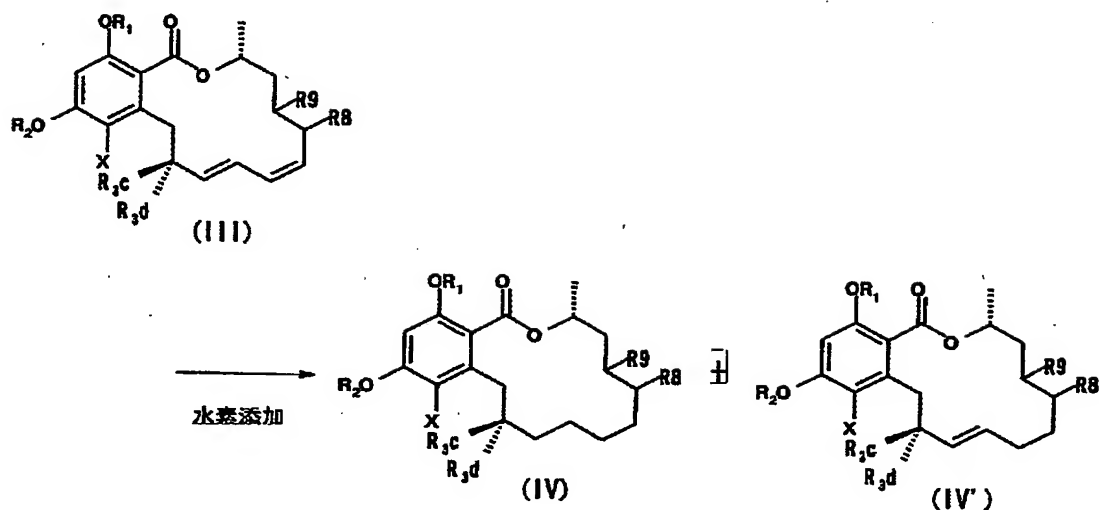
【0028】

(式中、 R^1 、 R^2 、 R^{3c} 、 R^{3d} 、 R^8 、 R^9 及び X は前記と同意義である。)

式(II)で表される化合物は、例えば、以下の製法を組み合わせることにより製造することができる。

【0029】

【化8】反応式1



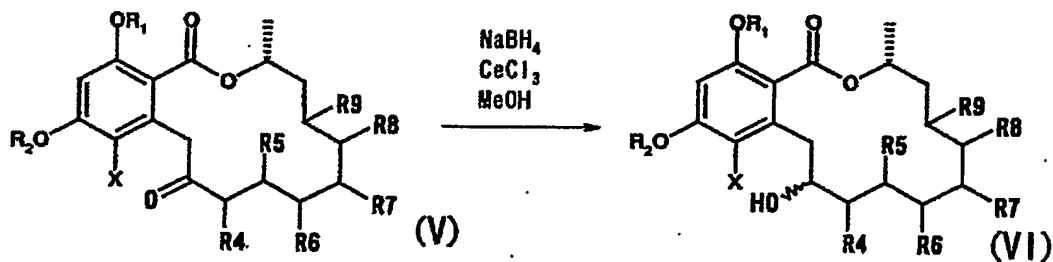
【0030】

(式中、 R^1 、 R^2 、 R^{3c} 、 R^{3d} 、 R^4 、 R^5 、 R^6 、 R^7 、 R^8 、 R^9 及びXは前記と同意義である。)

式 (III) の化合物をパラジウム炭素などの触媒存在下、有機溶媒（例えば、酢酸エチル、テトラヒドロフラン、ジエチルエーテル、エチルアルコール、メチルアルコールなど）中、水素添加反応を行い、式 (IV) あるいは式 (IV') の化合物、もしくはこれらの混合物を得る。これらの式 (IV) 及び式 (IV') の化合物はカラムクロマトグラフィーなど通常用いられる分離法にて分離精製することができる。

【0031】

【化9】反応式2



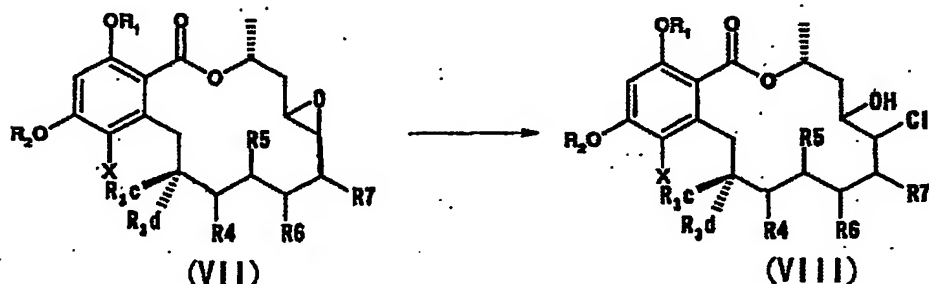
【0032】

(式中、 R^1 、 R^2 、 R^{3c} 、 R^{3d} 、 R^4 、 R^5 、 R^6 、 R^7 、 R^8 、 R^9 及びXは前記と同意義である。)

式(V)の化合物を水素化ホウ素カリウム、水素化ホウ素ナトリウム、水素化ホウ素リチウムなどの還元剤と、必要に応じてLiCl、 $MgCl_2$ 、 $CeCl_3$ 、 $CaCl_2$ 、NiCl等の塩類の共存下有機溶媒(例えば、テトラヒドロフラン、ジエチルエーテル、エチルアルコール、メチルアルコールなど)中、 $-20\sim 100^\circ C$ 、好ましくは $0\sim 20^\circ C$ で反応させ、式(VI)の化合物を得る。式(VI)の化合物はカラムクロマトグラフィーなど通常用いられる分離法にて分離精製することができる。

【0033】

【化10】反応式3



【0034】

(式中、 R^1 、 R^2 、 R^{3c} 、 R^{3d} 、 R^4 、 R^5 、 R^6 、 R^7 、 R^8 、 R^9 及びXは前記と同意義である。)

式(VII)の化合物を適当な有機溶媒(例えば、テトラヒドロフラン、ジエチルエーテル、エチルアルコール、メチルアルコールなど)中、酸又は塩基で処理することにより、式(VIII)の化合物を得る。

【0035】

<毛乳頭細胞増殖促進剤>

本発明において「毛乳頭細胞増殖促進剤」とは、毛乳頭細胞の数を増加させる作用をもつ医薬又は試薬を意味する。

【0036】

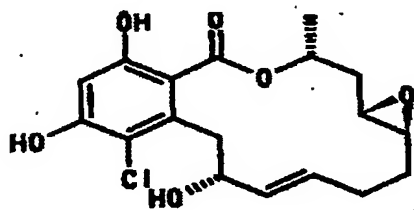
本発明の毛乳頭細胞増殖促進剤は、WNT-5A機能の阻害作用に基づくことを特徴とする。WNT-5Aは、WNT/ β -catenin経路が活性化するWNT-1 classのWNTs(1、8

など)の機能を抑制することから、WNT-5Aの機能の調整あるいはWNT-5Aの発現を調整することにより毛乳頭細胞の増殖を制御する。したがって、優れたWNT-5A機能の阻害作用を有すれば、全く構造の異なる化合物(例えば、化合物7や化合物24など)であっても、優れた毛乳頭細胞増殖促進作用を有する。

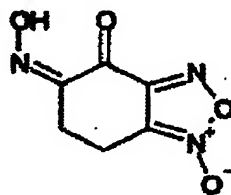
【0037】

【化11】

化合物7



化合物24



【0038】

細胞の増殖は、当業者に公知の方法により測定することができ、例えば適当な発色基質を用いた生細胞数計測、[3H]-チミジン取り込み法等を挙げることができる。発色基質としては、MTT、MTS、XTT等のテトラゾリウム塩を用いることが好ましい。

【0039】

<発毛剤／育毛剤>

本発明において「発毛剤又は育毛剤」とは、発毛誘導、毛成長促進、脱毛予防などの目的で使用される医薬品又は医薬部外品を意味する。本発明の発毛剤／育毛剤を医薬として用いる場合、適用対象としては、例えば円形脱毛症や脱毛症の改善あるいは予防などを挙げることができる。

【0040】

また、本発明の発毛剤／育毛剤の効果は、WNT-5A機能の抑制に基づく毛乳頭細胞増殖促進作用による。かかる作用機序により脱毛部毛乳頭において低下している細胞増殖能を亢進し、発達した毛乳頭組織を形成するため、これまでの育毛剤

／発毛剤では効果がえられなかった症状にも有効であることが予想される。

【0041】

本発明の発毛剤／育毛剤は、それぞれの化合物に基づき、種々の投与量及び投与形態で投与することができる。

【0042】

投与量は、育毛剤の種類、投与形態により異なるが、例えば、式 (II) で表される化合物を塗布投与（ローション剤、軟膏剤、ゲル剤等）する場合、0.0001～10重量％で投与することができ、好ましくは0.001～5重量％、更に好ましくは0.001～1重量％である。また、式 (II) で表される化合物を成人男性に経口投与（散剤、錠剤またはカプセル剤）する場合は、1～100mg/kg/日とすることが好ましい。

【0043】

本発明の発毛剤／育毛剤の投与形態は特に限定されるものではないが、外用での使用では、WNT-5A産生抑制剤、例えば式 (II) で表される化合物を有効成分とする発毛剤／育毛剤は水溶性組成物の形態で提供されることが好ましい。このような水溶性組成物の製造には、本発明の効果を損なわない限り医薬品、医薬部外品又は化粧品の製造に用いられる各種の添加物を配合することができる。本発明の発毛剤／育毛剤は、例えばヘアトニック、ヘアオイル、ヘアムース、ゲルなどの調髪用組成物、シャンプー、リンスなどの洗髪用組成物、或いは軟膏などとして提供することが可能である。

【0044】

また、経口での使用では、WNT-5A産生抑制剤、例えば式 (II) で表される化合物を製剤上許容しうる担体（賦形剤、結合剤、崩壊剤、矯味剤、矯臭剤、乳化剤など）、希釈剤、溶解補助剤などと配合して得られる医薬組成物を通常の方法に従って製剤して得られる錠剤、カプセル剤、顆粒剤、散剤、シロップ剤、懸濁剤、溶液剤などの形態で提供されることが望ましい。

なお、これらの製剤化は、通常の製剤化技術を使用することができる

＜スクリーニング方法＞

本発明はまた、WNT-5Aの機能を阻害する化合物を選択することを特徴とする

、毛乳頭細胞増殖促進剤のスクリーニング方法である。

【0045】

WNT-5Aの機能を阻害する化合物（以下、「WNT-5A機能阻害剤」ということがある。）を選択するとは、例えば、WNT-5A産生抑制剤を選択、即ちスクリーニングすることでもよく、また、WNT-5A受容体アンタゴニストを選択することでもよい。

【0046】

本発明のスクリーニング方法に供される被験物質としては、任意の物質を使用することができる。被験物質の種類は特に限定されず、個々の低分子化合物でよいし、天然物抽出物中に存在する化合物でもよく、合成ペプチドでもよい。また、化合物ライブラリー、コンビナトリアルライブラリーであってもよい。化合物ライブラリーの構築は当業者に公知であり、また市販の化合物ライブラリーを使用することもできる。スクリーニングの対象とする化合物は、医薬品として用いる観点から分子量3000以下であることが好ましく、塗布／経口投与を可能とする観点から、分子量600以下の低分子化合物であることが好ましい。

【0047】

①WNT-5A受容体アンタゴニストのスクリーニング方法

WNT-5A受容体アンタゴニストのスクリーニング方法において、標識したWNT-5A蛋白質及びWNT-5A受容体を用いて、該標識を検出又は測定することにより、WNT-5A蛋白質とWNT-5A受容体の結合の形成の有無を調べてもよい。標識としては、放射性同位元素（ ^{32}P 、 ^{33}P 、 ^{131}I 、 ^{125}I 、 ^3H 、 ^{14}C 、 ^{35}S 等）、酵素（アルカリフォスファターゼ、ホースラディッシュペーパーオキシターゼ等）、蛍光物質（フルオロセインイソチオシアネート等）等を挙げることができる。これらは市販のものを入手することができ、公知の方法によって標識される。

【0048】

*in vitro*のアッセイ系の1つの具体例は、非細胞系において行われる。具体的にはWNT-5A蛋白質又はWNT-5A受容体のいずれか一方を支持体に結合させ、ここにもう一方と被検物質を加え、インキュベートした後洗浄して支持体に結合した蛋白質に対するもう一方の蛋白質の結合を検出又は測定すればよい。

【0049】

蛋白質を結合させる支持体としては、例えば不溶性の多糖類、例えば、アガロース、デキストラン、セルロース、合成樹脂、例えばポリスチレン、ポリアクリルアミド、シリコン等が挙げられる。より具体的にはそれらを原料として製造される市販のビーズ、プレートが用いられる。

【0050】

②WNT-5A産生抑制化合物のスクリーニング方法

WNT-5A産生抑制化合物のスクリーニングは、WNT-5A mRNA量又はWNT-5A蛋白質量を指標として行うことができる。また、WNT-5A遺伝子のプロモーター領域にレポーター遺伝子を連結して発現量を検出することもできる。WNT-5A遺伝子のプロモーターとしては、配列番号3を使用することが好ましい。

【0051】

レポーター遺伝子としては、例えば、GFP遺伝子 (Green Fluorescent Protein)、GUS遺伝子 (β -Glucuronidase)、LUC遺伝子 (Luciferase)、CAT (Chloramphenicol acetyltransferase) 遺伝子 を挙げることができる。

WNT-5A mRNA量を指標とした場合としては、例えば、ヒトWNT-5A発現細胞を用い、薬剤を添加し、37℃、5%CO₂-95%airのインキュベータ内で数時間培養後、細胞を溶解してRNAを抽出し、RT-PCRなどを用いてWNT-5A mRNA量を測定することにより、WNT-5A mRNA量を減少させる活性を有する物質を探索することができる。PCRに用いるプライマーとしては、WNT-5A mRNAに特異的なものであれば特に制限はなく、WNT-5A mRNAの配列から設計することができるが、好ましくは、Forward Primer AATGTCTTCCAAGTTCTCCTAGTGGC (配列番号8) 及び Reverse Primer GATGTCCGAATTGATACTGGCA (配列番号9) である。

【0052】

WNT-5A 蛋白質量を指標とした場合としては、例えば、ヒトWNT-5A発現細胞を用い、薬剤を添加し、37℃、5%CO₂-95%airのインキュベータ内で数時間培養後、培養培地を用いて又は細胞を溶解して蛋白質を抽出し、ELISAなどを用いてWNT-5A 蛋白質量を測定することにより、WNT-5A 蛋白質発現量を減少させる活性を有する物質を探索することができる。

【 0 0 5 3 】

以下、実験例に基づき本発明を更に説明するが、本発明はこれらにより何ら限定されるものではない。

【 0 0 5 4 】

【実施例】

実施例 1 (化合物 3、4)

ラディシコール(化合物 1 : 10.8g)を酢酸エチル(140ml)に溶解し、5%パラジウム炭素(ウェットタイプ)(255mg)を加え、水素置換(1気圧)し室温で3時間攪拌した。パラジウム炭素を濾過後、濾液を減圧留去した。得られた残渣をシリカゲルクロマトグラフィーにて精製し、n-ヘキサン:酢酸エチル=2:1で溶出させることで、目的化合物 4 (3.43g)を得、n-ヘキサン:酢酸エチル=3:2で溶出させることで、目的化合物 3 (4.14g)を得た。

【 0 0 5 5 】

実施例 2 (化合物 7、8)

化合物 3 (602.5mg)をメタノール(13ml)に溶解し、塩化セリウム(III) 7水和物(2.14g)を加え、室温で30分間攪拌した。この溶液に水素化ホウ素ナトリウム(180mg)を氷冷しながら徐々に加えた後、室温で5分間攪拌した。反応液に飽和リン酸水素二ナトリウム(40ml)を加え水(40ml)で希釈した後、有機溶媒を減圧留去した。残った水層を酢酸エチル(300ml×2)で抽出し、得られた酢酸エチル層を無水硫酸ナトリウムで乾燥後、酢酸エチルを減圧留去した。残渣をシリカゲル分取薄層クロマトグラフィー(20cm×20cm, 1.0mm厚、クロロホルム:メタノール=9:3:7で展開、酢酸エチルで溶出)により粗精製した。得られた粗精製物を高速液体クロマトグラフィー(20φ×250mm, YMC-Pack Pro C18, 水(酢酸添加、pH3.5):アセトニトリル=65:35で溶出)により精製し、目的化合物(化合物 7 : 144.9mg、化合物 8 : 13.8mg)を得た。

【 0 0 5 6 】

実施例 3 (化合物 9,10)

化合物 4 (26.5mg)をメタノール(5ml)に溶解し、塩化セリウム(III) 7水和物(100mg)を加え、室温で30分間攪拌した。この溶液に水素化ホウ素ナトリウム(60

mg)を氷冷しながら徐々に加えた後、室温で30分間攪拌した。反応液に飽和リン酸水素二ナトリウム(12ml)を加え水(20ml)で希釈した後、有機溶媒を減圧留去した。残った水層を酢酸エチル(30ml×2)で抽出し、得られた酢酸エチル層を無水硫酸ナトリウムで乾燥後、酢酸エチルを減圧留去した。残渣をシリカゲル分取薄層クロマトグラフィー(20cm×20cm, 0.25mm厚、クロロホルム：メタノール=94：6で展開、酢酸エチルで溶出)により精製し、目的化合物(化合物9：5.7mg、化合物10：8.8mg)を得た。

【 0 0 5 7 】

実施例 4 (化合物 5)

ラディシコール(91.5mg)をメタノール(5ml)に溶解し、塩化セリウム(III) 7水和物(88mg)を加え、室温で10分間攪拌した。この溶液に水素化ホウ素ナトリウム(60mg)を氷冷しながら徐々に加えた後、室温で30分間攪拌した。反応液に飽和リン酸水素二ナトリウム(20ml)を加え水(20ml)で希釈した後、有機溶媒を減圧留去した。残った水層を酢酸エチル(50ml×3)で抽出し、得られた酢酸エチル層を無水硫酸ナトリウムで乾燥後、酢酸エチルを減圧留去した。残渣をシリカゲル分取薄層クロマトグラフィー(20cm×20cm, 0.5mm厚、クロロホルム：メタノール=9：1で展開、酢酸エチルで溶出)により精製し、目的化合物 5 (27.2mg)を得た。

【 0 0 5 8 】

実施例 5 (化合物 2)

ラディシコール(15.3mg)をピリジン(1.5ml)に溶解し、無水酢酸(4ml)を加え室温で6.5時間攪拌した後、反応液に氷水(20ml)を加え酢酸エチル(20ml)で抽出した。酢酸エチル層を水(20ml×2)で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥後、酢酸エチルを減圧留去した。得られた残渣をシリカゲル分取薄層クロマトグラフィー(20cm×20cm, 0.5mm厚、クロロホルム：メタノール=95：5で展開、酢酸エチルで溶出)により精製し、目的化合物 2 (18.5mg)を得た。

【 0 0 5 9 】

実施例 6 (化合物11)

ラディシコール(19.0mg)をジメチルスルホキシド(1ml)に溶解し、炭酸カリウ

ム(3mg)とヨウ化メチル(4ml)を加え室温で6.5時間攪拌した。反応液に水(20ml)を加え酢酸エチル(20ml)で抽出し、酢酸エチル層を無水硫酸ナトリウムで乾燥後、酢酸エチルを減圧留去した。得られた残渣をシリカゲル分取薄層クロマトグラフィー(20cm×20cm, 0.5mm厚、クロロホルム：メタノール=95：5で展開、酢酸エチルで溶出)により精製し、目的化合物11(15.3mg)を得た。

【 0 0 6 0 】

実施例 7 (化合物16、17、19、23)

ラディシコール(930mg)を1,4-ジオキサン(14ml)に溶解し、1規定塩酸(12ml)を加え室温で2時間攪拌した後、水(40ml)で希釈し酢酸エチル(100ml)で抽出した。酢酸エチルを無水硫酸ナトリウムで乾燥後、酢酸エチルを減圧留去した。得られた残渣をシリカゲル分取薄層クロマトグラフィー(20cm×20cm, 1.0mm厚、クロロホルム：メタノール：n-ヘキサン=5：1：5で展開、酢酸エチルで溶出)により粗精製した。得られた粗精製物を高速液体クロマトグラフィー(20φ×250mm, YMC-Pack Pro C18, 水(酢酸添加、pH3.5)：アセトニトリル=70：30～40：60、グラジエントで溶出)により精製し、目的化合物(化合物16：11.4mg、化合物17：19.4mg、化合物19：32.6mg、化合物23：103.7mg)を得た。

【 0 0 6 1 】

実施例 8 (化合物12、13)

ラディシコール(232.6mg)を1,4-ジオキサン(4ml)に溶解し、1規定塩酸(1ml)を加え室温で30分間攪拌した後、1規定水酸化ナトリウムで中和した。溶媒を減圧濃縮後メタノールを20ml加えて溶解させ、綿栓濾過後メタノールを減圧留去した。得られた残渣を高速液体クロマトグラフィー(20φ×250mm, YMC-Pack Pro C18, 水(酢酸添加、pH3.5)：アセトニトリル=65：35で溶出)により精製し、目的化合物(化合物12：42.6mg、化合物13：10.4mg)を得た。

【 0 0 6 2 】

実施例 9 (化合物18)

5mlのジメチルホルムアミドに1mlのオキシ塩化リンを氷冷しながら滴下した後、室温で30分間攪拌した。この溶液をラディシコール(98.5mg)のジメチルホルムアミド溶液(4ml)に氷冷しながら徐々に加えた後、室温で24時間攪拌した。反

応液を酢酸エチル(100ml)で希釈した後、水(100ml×3)で洗浄し、酢酸エチル層を無水硫酸ナトリウムで乾燥後、酢酸エチルを減圧留去した。得られた残渣をシリカゲル分取薄層クロマトグラフィー (20cm×20cm, 0.5mm厚、クロロホルム：メタノール=94：6で展開、酢酸エチルで溶出) により精製し、目的化合物(化合物18) (61.8mg)を得た。

【 0 0 6 3 】

実施例10 (化合物14、15)

ラディシコール(378mg)を1,4-ジオキサン(4ml)に溶解し、1規定塩酸(1ml)を加え室温で20分間攪拌した後、1規定水酸化ナトリウムで中和した。溶媒を減圧濃縮後メタノールを20ml加えて溶解させ、綿栓濾過後メタノールを減圧留去した。得られた残渣を高速液体クロマトグラフィー (20φ×250mm, YMC-Pack Pro C18, 水(酢酸添加、pH3.5)：アセトニトリル=70：30で溶出) により精製し、目的化合物(化合物14：10.7mg、化合物15：9.9mg)を得、同時に化合物12(40.6mg)も得られた。

【 0 0 6 4 】

実施例11 (化合物20、21、22)

化合物3(96.3mg)を1,4-ジオキサン(2ml)に溶解し、1規定塩酸(2.5ml)を加え室温で16時間攪拌した後、1規定水酸化ナトリウムで中和した。溶媒を減圧濃縮後メタノールを20ml加えて溶解させ、綿栓濾過後メタノールを減圧留去した。得られた残渣を高速液体クロマトグラフィー (20φ×250mm, YMC-Pack Pro C18, 水(酢酸添加、pH3.5)：アセトニトリル=45：55で溶出) により精製し、目的化合物(化合物20：9.3mg、化合物21：22.0mg、化合物22：26.2mg)を得た。

上記実施例にて合成した化合物及びそのデータを表1及び表2に示す。

(表1中の化合物は式(I)又は(II)で表される。)

【 0 0 6 5 】

【表1】表1

化合物	R1	R2	(R3c R3d)	R4	R5	R6	R7	R8	R9	X
1	H	H	=0	π	合	π	合	-	0-	Cl
2	Ac	Ac	=0	π	合	π	合	-	0-	Cl
3	H	H	=0	π	合	H	H	-	0-	Cl
4	H	H	=0	H	H	H	H	-	0-	Cl
11	Me	Me	=0	π	合	π	合	-	0-	Cl
12	H	H	=0	π	合	π	合	Cl	OH	Cl
13	H	H	=0	π	合	π	合	Cl	OH	Cl
14	H	H	=0	π	合	π	合	OH	OH	Cl
15	H	H	=0	π	合	π	合	OH	OH	Cl
17	H	H	=0	π	合	π	合	* 結	合	Cl
18	H	H	=0	π	合	π	合	Cl	0CH0	Cl

* 結合：-O-C(CH₃)-O-

【0066】

【表2】表1のつづき

化合物	R1	R2	R3a	R3b	R4	R5	R6	R7	R8	R8	X
5	H	H	H	OH	π 結	合	π 結	合	-	0-	Cl
6	H	H	OH	H	π 結	合	π 結	合	-	0-	Cl
7	H	H	H	OH	π 結	合	H	H	-	0-	Cl
8	H	H	OH	H	π 結	合	H	H	-	0-	Cl
9	H	H	H	OH	H	H	H	H	-	0-	Cl
10	H	H	OH	H	H	H	H	H	-	0-	Cl

化合物	R1	R2	(R3c R3d)	R4	R5	R8	R6	R7	R8	X
23	H	H	=0	H	-	0-	π 結 合	0H	Cl	

【0067】

【表3】表1のつづき

化合物	R1	R2	(R3c R3d)	R4	R5	R6	R7	R8	X
19	H	H	=0	H	-0-	π 結合	合	Cl	Cl
20	H	H	=0	H	-0-	H	H	Cl	Cl
21	H	H	=0	H	-0-	H	H	Cl	Cl
22	H	H	=0	H	-0-	H	H	Cl	Cl

【0068】

化合物	R1	R2	(R3c R3d)	R4	R5	R6	R7	R8	R9	X
16	H	H	=0	Cl	π 結合	合	π 結合	合	OH	Cl

【表 4】表 2

化合物番号	¹ H-NMR	¹³ C-NMR
1	(CDCl ₃ /CD ₃ OD, 500MHz) δppm: 1.48(d, J=6.7Hz, 3H), 1.83(ddd, J=15.3, 9.6, 3.7Hz, 1H), 2.33(dt, J=15.3, 3.7Hz, 1H), 2.94(dt, J=9.6, 3.0Hz, 1H), 3.18(s, 1H), 3.86(d, J=16.5Hz, 1H), 4.51(d, J=16.5Hz, 1H), 5.41(sxt, J=3.7Hz, 1H), 5.78(dd, J=9.8, 3.0Hz, 1H), 6.05(d, J=15.9Hz, 1H), 6.15(t, J=9.8Hz, 1H), 6.45(s, 1H), 7.48(dd, J=15.9, 9.8Hz, 1H)	(CDCl ₃ /CD ₃ OD, 125MHz) δppm: 18.5(q), 36.3(c), 46.3(t), 55.8(d), 56.1(d), 71.2(d), 103.4(d), 109.0(s), 116.1(s), 130.1(d), 130.5(d), 135.0(d), 135.7(s), 139.6(d), 158.2(s), 161.2(s), 168.9(s), 199.1(s)
2	(CDCl ₃ , 500MHz) δppm: 1.51(d, J=6.7Hz, 3H), 1.54(ddd, J=14.6, 9.5, 3.7Hz, 1H), 2.24(s, 3H), 2.31(s, 3H), 2.38(dt, J=14.6, 3.7Hz, 1H), 2.99(dt, J=8.5, 3.7Hz, 1H), 3.49(qui, J=1.8Hz, 1H), 3.91(d, J=15.9Hz, 1H), 4.04(d, J=15.9Hz, 1H), 5.37(dq, J=6.7, 3.7Hz, 1H), 5.74(dd, J=11.0, 3.7Hz, 1H), 6.03(d, J=16.5Hz, 1H), 6.12(t, J=11.0Hz, 1H), 7.02(s, 1H), 7.45(dd, J=16.5, 11.0Hz, 1H)	(CDCl ₃ , 125MHz) δppm: 18.6(q), 20.6(q), 20.7(q), 37.1(t), 45.1(t), 55.0(d), 55.4(d), 70.8(d), 117.8(d), 126.3(s), 126.5(s), 129.9(d), 130.6(d), 133.6(s), 136.1(d), 139.1(d), 146.6(s), 148.7(s), 163.8(s), 167.5(s), 168.1(s), 195.6(s)
3	(CDCl ₃ /CD ₃ OD, 500MHz) δppm: 1.21(m, 1H), 1.41(d, J=6.1Hz, 3H), 1.81(dt, J=15.9, 4.3Hz, 1H), 1.97(ddd, J=15.9, 4.9, 2.4Hz, 1H), 2.23(m, 1H), 2.35(ddd, J=14.0, 7.3, 2.4Hz, 1H), 2.48(dd, J=7.3, 3.7Hz, 1H), 2.52(dt, J=9.8, 2.4Hz, 1H), 2.74(sxt, J=2.4Hz, 1H), 4.27(d, J=18.3Hz, 1H), 4.40(d, J=18.3Hz, 1H), 5.21(dq, J=6.1, 4.3Hz, 1H), 6.05(dd, J=15.9, 1.2Hz, 1H), 6.48(s, 1H), 6.85(ddd, J=15.9, 11.0, 4.3Hz, 1H)	(CDCl ₃ /CD ₃ OD, 125MHz) δppm: 17.8(q), 29.2(t), 30.9(t), 36.4(t), 45.1(t), 56.0(d), 57.6(d), 72.1(d), 103.5(d), 106.3(s), 116.3(s), 130.1(d), 136.1(s), 148.0(d), 158.8(s), 163.4(s), 170.3(s), 197.0(s)
4	(CDCl ₃ /CD ₃ OD, 500MHz) δppm: 1.02(m, 1H), 1.32(d, J=6.4Hz, 3H), 1.36(m, 1H), 1.41(m, 2H), 1.64(m, 1H), 1.77(ddd, J=15.5, 6.4, 2.7Hz, 1H), 1.92(ddd, J=14.0, 7.0, 3.0Hz, 1H), 2.04(ddd, J=15.5, 5.5, 4.3Hz, 1H), 2.34(m, 2H), 2.53(dt, J=8.8, 3.0Hz, 1H), 2.68(m, 1H), 4.02(d, J=18.3Hz, 1H), 4.25(d, J=18.3Hz, 1H), 5.15(d'qui, J=6.4, 2.7Hz, 1H), 6.37(s, 1H)	(CDCl ₃ /CD ₃ OD, 125MHz) δppm: 18.6(q), 22.1(t), 23.2(t), 30.8(t), 36.1(t), 40.3(c), 46.5(t), 54.8(d), 57.6(d), 70.8(d), 103.1(d), 106.4(s), 115.6(s), 135.6(s), 158.2(s), 162.2(s), 169.6(s), 208.0(s)
5	(CD ₃ OD, 500MHz) δppm: 1.41(d, J=6.7Hz, 3H), 1.95(dd, J=16.1, 5.5Hz, 1H), 2.50(ddd, J=16.1, 7.6, 3.0Hz, 1H), 2.97(qui, J=3.0Hz, 1H), 3.18(dd, J=12.8, 4.0Hz, 1H), 3.28(m, 1H), 3.73(dd, J=12.8, 10.4Hz, 1H), 4.52(sep, J=4.0Hz, 1H), 5.21(m, 1H), 5.31(dd, J=11.3, 5.5Hz, 1H), 5.78~5.90(m, 3H), 6.35(s, 1H)	(CD ₃ OD, 125MHz) δppm: 20.1(q), 36.0(t), 40.0(t), 56.0(d), 57.2(d), 70.3(d), 72.7(d), 103.5(d), 108.6(s), 115.9(s), 127.4(d), 129.3(d), 130.7(d), 139.0(s), 139.1(d), 159.0(s), 162.8(s), 171.2(s)

【0069】

【表5】表2のつづき

化合物番号	¹ H-NMR	¹³ C-NMR
7	(CD ₃ OD, 500MHz) δppm: 1.19(m, 1H), 1.35(d, J=6.7Hz, 3H), 1.85(ddd, J=15.5, 5.2, 4Hz, 1H), 1.95(m, 1H), 2.01(m, 1H), 2.16(m, 1H), 2.27(ddd, J=15.5, 6.7, 3.0Hz, 1H), 2.50(dt, J=9.1, 3.0Hz, 1H), 2.85(qui, J=3.0Hz, 1H), 3.23(dd, J=12.5, 5.5Hz, 1H), 3.63(dd, J=12.5, 9.4Hz, 1H), 4.33(qui, J=5.5Hz, 1H), 5.07(d'qui, J=6.7, 2.4Hz, 1H), 5.28(dd, J=15.5, 5.5Hz, 1H), 5.38(ddd, J=15.5, 12.5, 5.5Hz, 1H), 6.32(s, 1H)	(CD ₃ OD, 125MHz) δppm: 20.2(q), 29.5(t), 31.3(t), 37.0(t), 40.2(t), 58.3(d), 59.6(d), 70.9(d), 71.8(d), 103.4(d), 109.3(d), 115.9(d), 129.1(d), 133.2(d), 140.0(d), 159.2(s), 163.0(s), 171.8(s)
8	(CD ₃ OD, 500MHz) δppm: 1.27(m, 1H), 1.35(d, J=6.1Hz, 3H), 2.02(m, 1H), 2.03(m, 1H), 2.05(m, 1H), 2.17(m, 1H), 2.20(m, 1H), 2.86(dd, J=5.8, 3.0Hz, 1H), 2.92(dt, J=8.5, 3.0Hz, 1H), 3.25(dd, J=12.8, 5.5Hz, 1H), 3.30(dd, J=12.8, 9.8Hz, 1H), 4.43(m, 1H), 4.93(d'ext, J=6.1, 1.8Hz, 1H), 5.37(dd, J=15.5, 4.0Hz, 1H), 5.64(dt, J=15.5, 6.1Hz, 1H), 6.41(s, 1H)	(CD ₃ OD, 125MHz) δppm: 20.4(q), 28.8(t), 31.2(t), 36.8(t), 39.7(t), 56.8(d), 57.6(d), 69.5(d), 70.6(d), 103.3(d), 114.7(s), 114.9(s), 129.7(d), 133.4(d), 138.5(s), 157.3(s), 158.2(s), 169.5(s)
9	(CD ₃ OD, 500MHz) δppm: 1.11(m, 1H), 1.43(m, 1H), 1.45(d, J=6.4Hz, 3H), 1.48(m, 1H), 1.52(m, 1H), 1.57(m, 1H), 1.74(ddd, J=15.5, 7.3, 2.4Hz, 1H), 2.09(d'qui, J=14.3, 2.4Hz, 1H), 2.36(ddd, J=15.5, 7.3, 2.4Hz, 1H), 2.71(dt, J=9.4, 2.4Hz, 1H), 3.03(dt, J=7.3, 2.4Hz, 1H), 3.21(dd, J=7.3, 1.8Hz, 2H), 3.88(m, 1H), 5.20(d'qui, J=6.4, 2.4Hz, 1H), 6.38(s, 1H)	(CD ₃ OD, 125MHz) δppm: 20.0(q), 25.2(t), 25.8(t), 32.2(t), 36.8(t), 38.0(t), 39.9(t), 58.2(d), 60.5(d), 71.4(d), 72.8(d), 103.0(d), 112.3(s), 115.3(s), 139.7(s), 158.0(s), 160.1(s), 171.1(s)
10	(CD ₃ OD, 500MHz) δppm: 1.29(m, 1H), 1.35(m, 2H), 1.38(m, 2H), 1.40(d, J=6.1Hz, 3H), 1.50(m, 1H), 1.57(m, 1H), 1.94(m, 1H), 2.37(m, 1H), 2.81(dt, J=7.3, 2.4Hz, 1H), 2.88(dt, J=7.3, 2.4Hz, 1H), 2.98(dd, J=13.4, 5.5Hz, 1H), 3.15(dd, J=13.4, 7.2Hz, 1H), 3.82(qui, J=6.1Hz, 1H), 5.12(d'ext, J=6.1, 2.4Hz, 1H), 6.39(s, 1H)	(CD ₃ OD, 125MHz) δppm: 20.5(q), 23.5(t), 24.6(t), 30.2(t), 35.1(t), 37.8(t), 39.2(t), 57.1(d), 59.1(d), 72.2(d), 72.3(d), 102.9(d), 114.6(s), 115.9(s), 138.5(s), 156.6(s), 156.8(s), 169.8(s)
11	(CDCl ₃ , 500MHz) δppm: 1.50(d, J=6.7Hz, 3H), 1.61(ddd, J=14.8, 6.3, 7Hz, 1H), 2.40(dt, J=14.6, 3.7Hz, 1H), 3.02(dt, J=8.6, 1.8Hz, 1H), 3.40(brt, J=1.8Hz, 1H), 3.75(d, J=15.9Hz, 1H), 3.83(s, 3H), 3.89(s, 3H), 3.95(d, J=15.9Hz, 1H), 5.35(dq, J=6.7, 3.7Hz, 1H), 5.69(dd, J=10.4, 4.3Hz, 1H), 6.07(d, J=15.9Hz, 1H), 6.12(t, J=10.4Hz, 1H), 6.45(s, 1H), 7.48(dd, J=15.9, 10.4Hz, 1H)	(CDCl ₃ , 125MHz) δppm: 18.6(q), 37.3(t), 45.2(t), 55.5(d), 55.6(d), 56.3(q), 56.4(q), 70.2(d), 95.5(d), 115.5(s), 117.9(s), 130.2(d), 131.0(d), 132.4(s), 135.6(d), 138.6(d), 156.3(s), 156.6(s), 166.0(s), 196.4(s)

【0070】

【表6】表2のつづき

化合物番号	¹ H-NMR	¹³ C-NMR
12	(CD3OD, 500MHz) δ ppm: 1.42(d, J=6.4Hz, 3H), 1.89(ddd, J=15.2, 9.1, 3.6Hz, 1H), 2.03(ddd, J=15.2, 7.0Hz, 1H), 3.66(d, J=16.2Hz, 1H), 3.99(ddd, J=9.1, 5.8Hz, 1H), 4.21(d, J=16.2Hz, 1H), 5.12(ddd, J=10.0, 5.8Hz, 1H), 5.38(dq, J=6.4, 3.6Hz, 1H), 5.75(t, J=10.0Hz, 1H), 5.95(d, J=16.1Hz, 1H), 6.17(t, J=11.0Hz, 1H), 6.46(s, 1H), 7.21(ddd, J=16.1, 11.0Hz, 1H)	(CD3OD, 125MHz) δ ppm: 19.3(q), 38.2(t), 45.7(t), 60.6(d), 70.9(d), 72.6(d), 103.9(d), 114.3(s), 116.3(s), 130.8(d), 132.6(d), 134.6(s), 138.1(d), 141.1(d), 156.9(s), 157.0(s), 168.1(s), 199.8(s)
13	(CD3OD, 500MHz) δ ppm: 1.46(d, J=6.1Hz, 3H), 1.96(ddd, J=14.0, 10.4, 3.0Hz, 1H), 2.12(ddd, J=14.0, 9.8, 3.0Hz, 1H), 3.76(d, J=15.3Hz, 1H), 3.88(dt, J=9.8, 3.0Hz, 1H), 4.73(d, J=15.3Hz, 1H), 5.00(ddd, J=9.8, 3.0Hz, 1H), 5.27(m, 1H), 6.00(d, J=15.9Hz, 1H), 6.02(t, J=9.8Hz, 1H), 6.14(t, J=9.8Hz, 1H), 6.46(s, 1H), 7.18(ddd, J=15.9, 9.8Hz, 1H)	(CD3OD, 125MHz) δ ppm: 20.8(q), 40.6(t), 44.5(t), 60.4(d), 71.0(d), 72.1(d), 104.1(d), 113.8(s), 115.7(s), 127.6(d), 131.7(d), 135.4(s), 138.6(d), 139.1(d), 157.8(s), 158.6(s), 168.5(s), 198.7(s)
14	(CD3OD, 500MHz) δ ppm: 1.42(d, J=6.7Hz, 3H), 1.87(ddd, J=15.3, 9.2, 3.7Hz, 1H), 1.95(ddd, J=15.3, 6.7Hz, 1H), 3.63(d, J=15.9Hz, 1H), 3.80(m, 1H), 4.18(d, J=15.9Hz, 1H), 4.78(ddd, J=8.6, 6.1Hz, 1H), 5.40(m, 1H), 5.73(ddd, J=11.0, 8.5Hz, 1H), 5.90(d, J=15.9Hz, 1H), 6.14(t, J=11.0Hz, 1H), 6.41(s, 1H), 7.30(ddd, J=15.9, 11.0Hz, 1H)	(CD3OD, 125MHz) δ ppm: 19.4(q), 37.8(t), 45.8(t), 71.2(d), 71.9(d), 72.0(d), 103.8(d), 114.3(s), 116.6(s), 130.0(d), 131.5(d), 134.7(s), 142.4(d), 142.9(d), 156.7(s), 156.9(s), 168.4(s), 200.2(s)
15	(CD3OD, 500MHz) δ ppm: 1.44(d, J=6.1Hz, 3H), 1.83(ddd, J=14.6, 9.8, 3.0Hz, 1H), 2.10(ddd, J=14.6, 9.8, 3.0Hz, 1H), 3.64(dt, J=9.8, 3.0Hz, 1H), 3.87(d, J=15.9Hz, 1H), 4.53(d, J=15.9Hz, 1H), 4.56(m, 1H), 5.45(m, 1H), 5.94(ddd, J=10.4, 7.3Hz, 1H), 5.96(d, J=15.9Hz, 1H), 6.12(t, J=10.4Hz, 1H), 6.44(s, 1H), 7.36(ddd, J=15.9, 10.4Hz, 1H)	(CD3OD, 125MHz) δ ppm: 21.0(q), 39.3(t), 44.5(t), 69.5(d), 71.2(d), 72.7(d), 104.0(d), 113.0(s), 115.9(s), 127.2(d), 131.3(d), 135.8(s), 140.6(d), 143.7(d), 158.2(s), 158.9(s), 168.7(s), 199.5(s)
16	(CD3OD, 500MHz) δ ppm: 1.29(d, J=6.1Hz, 3H), 1.70(ddd, J=11.6, 10.4, 2.4Hz, 1H), 2.17(dt, J=11.6, 6.1Hz, 1H), 4.01(d, J=18.9Hz, 1H), 4.05(m, 1H), 4.34(d, J=18.9Hz, 1H), 5.01(m, 1H), 5.46(d, J=9.8Hz, 1H), 5.82(ddd, J=15.3, 9.8Hz, 1H), 6.02(t, J=11.0Hz, 1H), 6.10(ddd, J=15.3, 11.0Hz, 1H), 6.30(t, J=11.0Hz, 1H), 6.45(s, 1H)	(CD3OD, 125MHz) δ ppm: 20.6(q), 42.3(t), 42.4(t), 62.9(d), 70.4(d), 71.5(d), 103.8(d), 115.0(s), 116.4(s), 126.2(d), 127.6(d), 133.4(s), 134.8(d), 140.8(d), 156.5(s), 156.6(s), 169.4(s), 201.0(s)

【0071】

【表7】表2のつづき

化合物番号	¹ H-NMR	¹³ C-NMR
17	(CD3OD, 500MHz) δ ppm: 1.38(s, 3H), 1.48(d, J=6.4Hz, 3H), 1.87(dd, J=16.1, 9.1Hz, 1H), 2.08(ddd, J=16.1, 5.8, 1.8Hz, 1H), 3.73(dd, J=9.1, 5.8Hz, 1H), 3.85(d, J=16.4Hz, 1H), 4.38(d, J=16.4Hz, 1H), 4.71(t, J=9.1Hz, 1H), 5.65(m, 1H), 5.78(dd, J=11.3, 9.1Hz, 1H), 6.03(d, J=16.1Hz, 1H), 6.32(t, J=11.3Hz, 1H), 6.47(s, 1H), 7.83(dd, J=16.1, 11.3Hz, 1H)	(CD3OD, 125MHz) δ ppm: 21.8(q), 27.2(q), 27.3(q), 34.5(t), 45.9(t), 70.3(d), 75.9(d), 78.9(d), 103.8(d), 110.1(s), 111.0(s), 116.2(s), 130.3(d), 131.3(d), 136.6(s), 138.7(d), 142.2(d), 158.8(s), 160.3(s), 169.1(s), 200.4(s)
18	(CDCl3/CD3OD, 500MHz) δ ppm: 1.52(d, J=6.4Hz, 3H), 2.02(ddd, J=14.9, 9.1, 4.0Hz, 1H), 2.09(dd, J=14.9, 6.4Hz, 1H), 3.79(d, J=16.1Hz, 1H), 4.20(d, J=16.1Hz, 1H), 5.23(dd, J=10.0, 5.8Hz, 1H), 5.34(dt, J=6.4, 4.0Hz, 1H), 5.39(dd, J=8.8, 5.8Hz, 1H), 5.73(t, J=10.0Hz, 1H), 6.00(d, J=16.1Hz, 1H), 6.16(t, J=11.0Hz, 1H), 6.48(s, 1H), 7.18(dd, J=16.1, 11.0Hz, 1H), 8.02(s, 1H)	(CDCl3/CD3OD, 125MHz) δ ppm: 19.0(q), 35.4(t), 45.4(t), 56.8(d), 70.0(d), 73.3(d), 103.6(d), 114.0(s), 115.1(s), 130.9(d), 133.1(d), 133.6(s), 135.6(d), 139.2(d), 156.3(s), 156.4(s), 160.6(d), 167.3(s), 198.8(s)
19	(DMSO-d6, 500MHz) δ ppm: 1.25(d, J=6.1Hz, 3H), 1.74(ddd, J=15.3, 10.4, 7.9Hz, 1H), 2.01(d, J=15.3Hz, 1H), 2.49(dd, J=14.6, 3.0Hz, 1H), 3.11(dd, J=14.6, 12.2Hz, 1H), 3.81(t, J=7.9Hz, 1H), 3.92(d, J=17.7Hz, 1H), 3.97(d, J=17.7Hz, 1H), 4.38(dd, J=7.9, 1.8Hz, 1H), 4.61(d, J=12.2Hz, 1H), 5.11(m, 1H), 5.83(dt, J=10.4, 1.8Hz, 1H), 5.91(dt, J=10.4, 1.8Hz, 1H), 6.47(s, 1H), 9.97(br, s, 1H), 10.35(br, s, 1H)	(DMSO-d6, 125MHz) δ ppm: 20.8(q), 37.8(t), 43.3(t), 46.0(t), 56.1(d), 69.2(d), 72.1(d), 72.6(d), 102.2(d), 112.3(s), 115.0(s), 128.9(d), 131.6(d), 131.8(s), 154.0(s), 154.7(s), 167.2(s), 202.8(s)
20	(CDCl3, 500MHz) δ ppm: 1.40(d, J=6.4Hz, 3H), 1.77(ddd, J=10.4, 7.9, 1.5Hz, 1H), 1.91(m, 1H), 2.04(m, 1H), 2.13(m, 1H), 2.23(dd, J=12.5, 7.3Hz, 1H), 2.42(dd, J=14.6, 4.9Hz, 1H), 2.73(dd, J=15.6, 11.3Hz, 1H), 3.04(dd, J=14.6, 4.6Hz, 1H), 3.30(t, J=10.0Hz, 1H), 3.91(ddd, J=10.4, 7.9, 1.5Hz, 1H), 4.13(d, J=18.3Hz, 1H), 4.42(sxt, J=4.6Hz, 1H), 4.94(d, J=18.3Hz, 1H), 5.26(sxt, J=6.4Hz, 1H), 6.60(s, 1H), 11.9(br, s, 1H)	(CDCl3, 125MHz) δ ppm: 20.6(q), 27.2(t), 28.7(t), 42.5(t), 45.3(t), 50.4(t), 58.6(d), 72.3(d), 78.1(d), 81.3(d), 103.8(d), 107.4(s), 114.5(s), 135.8(s), 156.3(s), 164.1(s), 170.3(s), 206.1(s)
21	(CDCl3/CD3OD, 500MHz) δ ppm: 1.20(d, J=6.1Hz, 3H), 1.41(m, 1H), 1.68(m, 1H), 1.70(m, 1H), 1.75(m, 1H), 2.13(d, J=13.4Hz, 1H), 2.16(dd, J=11.0, 2.7Hz, 1H), 2.22(m, 1H), 2.57(t, J=11.0Hz, 1H), 3.28(t, J=9.8Hz, 1H), 3.42(ddd, J=11.6, 9.8, 4.6Hz, 1H), 3.51(dt, J=11.0, 2.7Hz, 1H), 4.13(d, J=19.2Hz, 1H), 5.05(d sxt, J=6.1, 1.8Hz, 1H), 5.31(br, d, J=19.2Hz, 1H), 6.33(s, 1H)	(CDCl3/CD3OD, 125MHz) δ ppm: 20.8(q), 32.4(t), 34.1(t), 37.9(t), 47.3(t), 47.9(t), 57.5(d), 74.4(d), 76.2(d), 81.7(d), 102.8(d), 107.6(s), 115.0(s), 134.7(s), 157.3(s), 161.3(s), 170.5(s), 207.0(s)

【0072】

【表 8】表 2 の つづ き

化合物番号	¹ H-NMR	¹³ C-NMR
22	(CDCl ₃ /CD ₃ OD, 500MHz) δppm: 1.30(d, J=6.1Hz, 3H), 1.75(dd, J=11.6, 5.5Hz, 1H), 1.80(d, J=14.6Hz, 1H), 1.99(m, 1H), 2.18(m, 2H), 2.54(br.s, 2H), 2.85(br.s, 2H), 3.82(m, 1H), 3.91(br.s, 1H), 4.42(br.s, 1H), 5.15(m, 1H), 6.43(s, 1H)	(CDCl ₃ /CD ₃ OD, 125MHz) δppm: 21.4(q), 27.0(t), 28.7(t), 35.8(t), 46.9(t), 46.9(t), 58.6(d), 68.2(d), 74.1(d), 77.0(d), 103.2(d), 107.0(s), 115.5(s), 134.8(s), 158.0(s), 162.1(s), 170.9(s), 205.0(s)
23	(DMSO-d ₆ , 500MHz) δppm: 1.26(d, J=6.7Hz, 3H), 1.44(ddd, J=14.6, 7.9, 3.0Hz, 1H), 2.16(d, J=12.8Hz, 1H), 2.37(dd, J=14.6, 5.5Hz, 1H), 2.76(dd, J=14.6, 4.9Hz, 1H), 3.20(m, 1H), 3.71(d, J=18.3Hz, 1H), 3.90(d, J=18.3Hz, 1H), 4.21(dt, J=9.8, 1.8Hz, 1H), 4.88(d, J=6.7Hz, 1H), 5.01(br.s, 1H), 5.20(sep, J=3.7Hz, 1H), 5.89(dt, J=6.1, 1.8Hz, 1H), 6.00(dt, J=6.1, 1.8Hz, 1H), 6.50(s, 1H), 9.97(s, 1H), 10.47(br.s, 1H)	(DMSO-d ₆ , 125MHz) δppm: 19.2(q), 37.6(t), 45.1(t), 48.3(t), 69.7(d), 70.3(d), 83.3(d), 88.4(d), 102.4(d), 111.7(s), 115.3(s), 129.3(d), 130.0(d), 130.2(s), 154.4(s), 154.7(s), 166.4(s), 203.8(s)

【0073】

実験例12 毛乳頭細胞におけるWNT mRNAの発現

ヒト毛乳頭細胞は、東洋紡から購入し、12%FBSを添加したMEM（ギブコ）を用いて培養した。ヒト毛包角化細胞は、荒瀬らの方法（J.Dermatol.Sci.2,66-70(1991)）に従って、抜毛髪から分離しKGM-2（三光純薬）を用いて培養した。

【0074】

継代5回目の毛乳頭細胞及び継代2回目の毛包角化細胞を、 2×10^6 cells/wellとなるように10cmシャーレに播種し、二晩培養した。培地を除去し、細胞をPBS（－）で洗浄後、TRIzol試薬（インビトロジェン）を用いてtotal RNAを抽出した。各total RNA 50ng、WNT-5A又は glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) 特異的なプライマー（WNT-5A forward: AATGTCTTCCAAGTTCTTCCTAGTGGC（配列番号8）、WNT-5A reverse: GATGTCGGAATTGATACTGGCA（配列番号9）、GAPDH forward: ACCACAGTCCATGCCATCAC（配列番号10）、GAPDH reverse: TCCACCACCCTGTTGCTGTA（配列番号11））各0.4 μ M、及びSUPERSCRIPT One-Step RT-PCR with PLATINUM Taq（インビトロジェン）を用いて、SUPERSCRIPT One-Step RT-PCR with PLATINUM Taq添付のプロトコールに従い、全量25 μ lの反応系で、50℃で30分間first strand合成を行った後、94℃で2分間加熱、その後、94℃で30秒、55℃で30秒、72℃で30秒を23または20サイクル繰り返し、各cDNA断片を増幅した。

【0075】

この反応液を、1.5%アガロースゲルを用いて電気泳動し、エチジウムブロマ이드にて染色した。結果を図1に示す。

【0076】

毛乳頭細胞（DPC）由来のRNAを用いた場合は、WNT-5A特異的なプライマーを用いた23サイクルのPCRにおいて、顕著なcDNA断片の増幅が認められた。一方、毛包角化細胞（HFC）由来のRNAを用いた場合は、同条件において、増幅産物は認められなかった。

【0077】

実験例13 WNT-5A mRNA量減少活性の測定

ヒト毛乳頭細胞は、東洋紡から購入し、12%FBSを添加したMEM（ギブコ）を用

いて培養した。

【0078】

継代5回目の毛乳頭細胞を、 1.6×10^5 cells/wellとなるように12穴プレートに播種し、一晚培養した。化合物無添加培地、または化合物1、2、3、4、5、7、9又は24添加培地と交換し、更に24時間、培養を行った。培養終了時、培地を除去し、細胞をPBS(-)で洗浄後、TRIzol試薬(インビトロジェン)を用いてtotal RNAを抽出した。各total RNA 50ng、WNT-5A又はGAPDH特異的なプライマー(WNT-5A forward: AATGTCTTCCAAGTTCTTCCTAGTGGC(配列番号8)、WNT-5A reverse: GATGTCGGAATTGATACTGGCA(配列番号9)、GAPDH forward: ACCACAGTCCATGCCATCAC(配列番号10)、GAPDH reverse: TCCACCACCCTGTTGCTGTA(配列番号11))各0.4 μ M、及びSUPERSCRIPT One-Step RT-PCR with PLATINUM Taq(インビトロジェン)を用いて、SUPERSCRIPT One-Step RT-PCR with PLATINUM Taq添付のプロトコルに従い、全量25 μ lの反応系で、50℃で30分間first strand合成を行った後、94℃で2分間加熱、その後、94℃で30秒、55℃で30秒、72℃で30秒を23または20サイクル繰り返し、WNT-5AまたはGAPDHのcDNA断片を増幅した。

【0079】

この反応液を、1.5%アガロースゲルを用いて電気泳動し、エチジウムブロマイドにて染色した。結果を図2に示す。

【0080】

WNT-5A特異的なプライマーを用いた23サイクルのPCRにおいて、化合物無添加で培養した場合と比較して、化合物を添加した培養では、WNT-5A cDNA断片の増幅が顕著に減少した。

【0081】

一方、GAPDH特異的なプライマーを用いた20サイクルのPCRにおいて、GAPDH cDNA断片の増幅は、化合物の添加の有無に関わらず、変動が認められなかった。

【0082】

実験例14 毛乳頭細胞増殖促進活性試験

ヒト毛乳頭細胞は、東洋紡から購入し、12%FBSを添加したMEM(ギブコ)を用

いて培養した。

【0083】

継代5回目の毛乳頭細胞を、 1.5×10^4 cells/wellとなるようにスフェロイド培養用96穴プレートに播種し、一晚培養した。化合物無添加培地、または化合物1、2、3、4、5、7、9又は24添加培地と交換し、更に72時間培養を行った。培養終了時の細胞数をCell counting kit (和光純薬)を用いて測定した。即ち、培養終了5時間前に培地の1/10量のWST-1試薬を培地に添加し、培養終了時、培地の吸光度 (O. D. 450nm/620nm) を測定した。細胞数と吸光度は、細胞数 $0.25 \sim 4 \times 10^4$ cells/wellの範囲で正の相関関係が認められた。

【0084】

その結果、WNT-5A mRNA量減少活性を有する化合物が、毛乳頭細胞の増殖を促進する活性を有することが明らかになった (図3)。図中の値は、対照群6well、化合物添加群3wellの平均値である。対照群と化合物添加群との比較にはスチューデントのt検定を用いた。

* : $P < 0.05$, ** : $P < 0.01$, *** : $P < 0.001$

上記実験例により、WNT-5Aがヒト毛乳頭細胞に発現していること、ヒト毛乳頭細胞のWNT-5A mRNA量が本発明に係る化合物により減少すること、更に、WNT-5A mRNA量減少活性を有する化合物が、毛乳頭細胞の増殖を促進する活性を有することが示された。

【0085】

【発明の効果】

WNT-5A機能阻害剤、例えば、WNT-5A mRNA量を減少させる活性を有する化合物又はその医薬上許容される塩は、毛乳頭細胞増殖活性を有し、新規な作用機序による発毛剤/育毛剤として有用である。

【0086】

本発明は、WNT-5Aの機能を阻害する化合物が、脱毛症の改善剤もしくは予防剤になるという、今までにない全く新しい概念を提供するものであり、WNT-5Aの機能を阻害する化合物をスクリーニングは、新規な発毛剤/育毛剤の開発に有用である。

【図面の簡単な説明】

【図 1】毛乳頭細胞にWNT-5A mRNAが発現していることを示す図である。

【図 2】被験化合物が毛乳頭細胞においてWNT-5A mRNA量を減少させることを示す図である。

【図 3】被験化合物が毛乳頭細胞の増殖促進活性を有することを示すグラフである。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110>TAISHO PHARMACEUTICAL CO., LTD.

<120>HAIR GROWTH PREPARATION

<130>00TS-P3320

<160>11

<210>1

<211>365

<212>PROTEIN

<213>HOMO SAPIENS

<400>1

Met	Ala	Gly	Ser	Ala	Met	Ser	Ser	Lys	Phe	Phe	Leu	Val	Ala	Leu
				5					10					15
Ala	Ile	Phe	Phe	Ser	Phe	Ala	Gln	Val	Val	Ile	Glu	Ala	Asn	Ser
				20					25					30
Trp	Trp	Ser	Leu	Gly	Met	Asn	Asn	Pro	Val	Gln	Met	Ser	Glu	Val
				35					40					45
Tyr	Ile	Ile	Gly	Ala	Gln	Pro	Leu	Cys	Ser	Gln	Leu	Ala	Gly	Leu
				50					55					60
Ser	Gln	Gly	Gln	Lys	Lys	Leu	Cys	His	Leu	Tyr	Gln	Asp	His	Met
				65					70					75
Gln	Tyr	Ile	Gly	Glu	Gly	Ala	Lys	Thr	Gly	Ile	Lys	Glu	Cys	Gln
				80					85					90

Tyr Gln Phe Arg His Arg Arg Trp Asn Cys Ser Thr Val Asp Asn	95	100	105
Thr Ser Val Phe Gly Arg Val Met Gln Ile Gly Ser Arg Glu Thr	110	115	120
Ala Phe Thr Tyr Ala Val Ser Ala Ala Gly Val Val Asn Ala Met	125	130	135
Ser Arg Ala Cys Arg Glu Gly Glu Leu Ser Thr Cys Gly Cys Ser	140	145	150
Arg Ala Ala Arg Pro Lys Asp Leu Pro Arg Asp Trp Leu Trp Gly	155	160	165
Gly Cys Gly Asp Asn Ile Asp Tyr Gly Tyr Arg Phe Ala Lys Glu	170	175	180
Phe Val Asp Ala Arg Glu Arg Glu Arg Ile His Ala Lys Gly Ser	185	190	195
Tyr Glu Ser Ala Arg Ile Leu Met Asn Leu His Asn Asn Glu Ala	200	205	210
Gly Arg Arg Thr Val Tyr Asn Leu Ala Asp Val Ala Cys Lys Cys	215	220	225
His Gly Val Ser Gly Ser Cys Ser Leu Lys Thr Cys Trp Leu Gln	230	235	240
Leu Ala Asp Phe Arg Lys Val Gly Asp Ala Leu Lys Glu Lys Tyr	245	250	255
Asp Ser Ala Ala Ala Met Arg Leu Asn Ser Arg Gly Lys Leu Val	260	265	270
Gln Val Asn Ser Arg Phe Asn Ser Pro Thr Thr Gln Asp Leu Val	275	280	285
Tyr Ile Asp Pro Ser Pro Asp Tyr Cys Val Arg Asn Glu Ser Thr	290	295	300
Gly Ser Leu Gly Thr Gln Gly Arg Leu Cys Asn Lys Thr Ser Glu			

305	310	315
Gly Met Asp Gly Cys Glu Leu Met Cys Cys Gly Arg Gly Tyr Asp		
320	325	330
Gln Phe Lys Thr Val Gln Thr Glu Arg Cys His Cys Lys Phe His		
335	340	345
Trp Cys Cys Tyr Val Lys Cys Lys Lys Cys Thr Glu Ile Val Asp		
350	355	360
Gln Phe Val Cys Lys		
365		

<210>2

<211>4428

<212>DNA

<213>HOMO SAPIENS

<400>2

```

ttaaggaaat ccgggctgct cttccccatc tggaagtggc tttccccaca tcggctcgta 60
aactgattat gaaacatacg atgttaattc ggagctgcat ttcccagctg ggcactctcg 120
cgcgctggtc cccggggcct cgccccccac cccctgccct tccctcccgc gtcctgcccc 180
cactctccac cccccgcgt ggccaccccg cctccttggc agcctctggc ggcagcgcg 240
tccactcgcc tcccgtgctc ctctcgccca tggaattaat tctggctcca cttgttgctc 300
ggcccagggtt ggggagagga cggagggttg cgcagcggg ttcctgagtg aattaccag 360
gagggactga gcacagcacc aactagagag gggtcagggg gtgcgggact cgagcgagca 420
ggaaggaggc agcgccctggc accagggtt tgactcaaca gaattgagac acgtttgtaa 480
tcgctggcgt gccccgcgca caggatccca gcgaaaatca gatttcctgg tgaggttgcg 540
tggttggtt aatttgaaa aagaaactgc ctatatctt ccatcaaaaa actcacggag 600
gagaagcgca gtcaatcaac agtaaaacta agagaccccc gatgctcccc tggtttaact 660
tgtatgcttg aaaattatct gagagggaat aaacatcttt tccttcttc ctctccagaa 720
gtccattgga atattaagcc caggagtgc tttggggatg gctggaagt caatgtcttc 780
caagttcttc ctagtggctt tggccatatt tttctccttc gccagggtt taattgaagc 840
caattcttgg tggctgctag gtatgaataa ccctgttcag atgtcagaag tatatattat 900

```

aggagcacag cctctctgca gccaaactggc aggactttct caaggacaga agaaactgtg 960
 ccacttgtat caggaccaca tgcagtacat cggagaaggc gcgaagacag gcatcaaaga 1020
 atgccagtat caattccgac atcgacgggtg gaactgcagc actgtggata acacctctgt 1080
 ttttggcagg gtgatgcaga taggcagccg cgagacggcc ttcacatacg ccgtgagcgc 1140
 agcaggggtg gtgaacgcca tgagccgggc gtgccgcgag ggcgagctgt ccacctgcgg 1200
 ctgcagccgc gccgcgcgcc ccaaggacct gccgcgggac tggctctggg gcggctgcgg 1260
 cgacaacatc gactatggct accgctttgc caaggagttc gtggacgccc gcgagcggga 1320
 gcgcatccac gccaaagggt cctacgagag tgctcgcac ctcataaacc tgcacaacaa 1380
 cgaggccggc cgcaggacgg tgtacaacct ggctgatgtg gcctgcaagt gccatgggggt 1440
 gtccgggtca tgtagcctga agacatgctg gctgcagctg gcagacttcc gcaagggtggg 1500
 tgatgccctg aaggagaagt acgacagcgc ggcggccatg cggctcaaca gccggggcaa 1560
 gttggtacag gtcaacagcc gcttcaactc gcccaccaca caagacctgg tctacatcga 1620
 cccagccct gactactgcg tgcgcaatga gagcaccggc tcgctgggca cgcagggccg 1680
 cctgtgcaac aagacgtcgg agggcatgga tggctgcgag ctcatagtgt gcggccgtgg 1740
 gtacgaccag ttcaagaccg tgcagacgga gcgctgccac tgcaagttcc actggtgctg 1800
 ctacgtcaag tgcaagaagt gcacggagat cgtggaccag tttgtgtgca agtagtgggt 1860
 gccaccacgc actcagcccc gctcccagga cccgcttatt tatagaaagt acagtgattc 1920
 tggtttttgg ttttagaaa tttttttat ttttcccaa gaattgcaac cggaaccatt 1980
 ttttttcctg ttaccatcta agaactctgt ggtttattat taatattata attattattt 2040
 ggcaataatg ggggtgggaa ccacgaaaaa tttttttt gtggatcttt gaaaaggtaa 2100
 tacaagactt cttttggata gtatagaatg aagggggaaa taacacatac cctaacttag 2160
 ctgtgtggga catggtacac atccagaagg taaagaaata cttttcttt tttcaaata 2220
 tgccatcata tgggatgggt aggttccagt tgaaagaggg tggtagaaat ctattcacia 2280
 ttcagcttct atgacaaaaa tgagttgtaa attctctggt gcaagataaa aggtcttggg 2340
 aaaacaaaac aaaacaaaac aaacctccct tcccagcag ggctgctagc ttgctttctg 2400
 ctttttcaa atgataattt acaatggaag gacaagaatg tcatattctc aaggaaaaaa 2460
 ggtatatcac atgtctcatt ctctcaaat attccatttg cagacagacc gtcattattct 2520
 aatagctcat gaaatttggg cagcaggag gaaagtcccc agaaattaaa aaatttaaaa 2580
 ctcttatgtc aagatgttga tttgaagctg ttataagaat tgggattcca gatttgtaaa 2640

aagaccccca atgattctgg acactagatt ttttgtttgg ggaggttggc ttgaacataa 2700
atgaaatata ctgtattttc ttagggatac ttggttagta aattataata gtagaaataa 2760
tacatgaata ccattcacag gtttctcagc ccaagcaaca aggtaattgc gtgccattca 2820
gcactgcacc agagcagaca acctatttga ggaaaaacag tgaaatccac cttcctcttc 2880
acactgagcc ctctctgatt cctccgtgtt gtgatgtgat gctggccacg tttccaaacg 2940
gcagctccac tgggtccctt ttggttgtag gacaggaaat gaaacattag gagctctgct 3000
tggaacacag ttcactactt agggtttttt gtttctctaa actttttatt tgaggagcag 3060
tagttttcta tgttttaatg acagaacttg gctaattgaa ttcacagagg tgttgcagcg 3120
tatcactgtt atgacctgtt gtttagatta tccactcatg cttctcctat tgtactgcag 3180
gtgtacctta aaactgttcc cagtgtactt gaacagttgc atttataagg ggggaaatgt 3240
ggtttaatgg tgcctgatat ctcaaagtct ttgtacata acatatatat atatatacat 3300
atatataaat ataaatataa atatatctca ttgcagccag tgatttagat ttacagctta 3360
ctctgggggtt atctctctgt ctagagcatt gttgtccttc actgcagtc agttgggatt 3420
attccaaaag ttttttgagt cttgagcttg ggctgtggcc ccgctgtgat cataccctga 3480
gcacgacgaa gcaacctcgt ttctgaggaa gaagcttgag ttctgactca ctgaaatgcg 3540
tgttgggttg aagatatctt tttttctttt ctgcctcacc cttttgtctc caacctccat 3600
ttctgttcac ttgttgaga gggcattact tgttcgttat agacatggac gttaagagat 3660
attcaaaact cagaagcatc agcaatgttt ctcttttctt agttcattct gcagaatgga 3720
aacctatgcc tattagaaat gacagtactt attaattgag tccctaagga atattcagcc 3780
cactacatag atagcttttt tttttttttt ttttttttaa taaggacacc tctttccaaa 3840
caggccatca aatatgttct tatctcagac ttacgttggt ttaaaagttt ggaaagatac 3900
acatcttttc ataccccccc ttaggagggtt gggctttcat atcacctcag ccaactgttg 3960
ctcttaattt attgcataat gatatccaca tcagccaact gtggctcttt aatttattgc 4020
ataatgatat tcacatcccc tcagttgcag tgaattgtga gcaaaagatc ttgaaagcaa 4080
aaagcactaa ttagtttaaa atgtcacttt ttgggttttt attatacaaa aacctgaag 4140
tacttttttt atttgctaaa tcagattgtt cttttttagt gactcatgtt tatgaagaga 4200
gttgagtta acaatcctag cttttaaaag aaactattta atgtaaaata ttctacatgt 4260
cattcagata ttatgtatat ctctagcct ttattctgta cttttaatgt acatatttct 4320
gtcttgctg atttgatat ttactgggt taaaaaaca acatcgaaag gcttattcca 4380

aatggaagat agaataataa ataaaacgtt acttgtaaaa aaaaaaaa

4428

<210>3

<211>2460

<212>DNA

<213>HOMO SAPIENS

<400>3

cgtggcacgc gcggaagatt ctcagtgtcc ttacagagtc atcttcctg agccccggaa 60
 gtgttgaaa acatttagcc ccttctttgg gaaactcagt ttctgatcag aatttttggt 120
 ttaccctggg gttgacagtc tcgccagagg tctcatttca tactgtcttt tcggatctga 180
 tcctcttggg aaacaggcgg ggatgtttta ccctacagag ccgatgtatg tgtgagttcg 240
 ctgtgagttc ttgagtgct tcaaacttgt ggggcctttt ctcggttgca ctgggattga 300
 agagggaaga ggcccaaggt gtttccgggc aagcggcggg gttaagtga gatgcgactc 360
 gtgaggctct cctttccgat ccccttttgg gacaccctct gcctacctct accctggagc 420
 caggagagacc caagtcttgg tgaccggatg ggcccgtct cagttggcct gggctctggg 480
 aactgggtga ctctccctgg gggcttcggg ctgggagtgg gttcggtttg tgtggcttcg 540
 gctctaaca agagatccgc tgtaatccgc cgaatctgtt atcaatttct ctgctgcttg 600
 agccccgcc caccgcgcc gcccgccgag aagcttgga agtgcacgc gccagcacca 660
 atctgggccg ctgactcgga aacatgtcgc agcgtgtgtg tctatggacg cgtgtgagtg 720
 tgtaaagtgt cacgagtgtg aatgtgtatg atgtgtgtgc acgcggcatc ggctgccctt 780
 ggggagagtt gactttgcag cctgggctgc gcgagaagca gactttgcag cccactccct 840
 cccctggagg aaatttgaca cttagggcgg ggggtggggag atagccggag ccttctctct 900
 cctagctggg gaaaccccag atttccattc tccaggatgc gccccccagc ttgacagcgt 960
 cttggggaca actggccttg ttttgagacc ctgcttagca ggcgctgggg accacataag 1020
 cattctctt tggagaagcc ccgaagcgtc caggccaaag ggggcggttc acggaagaaa 1080
 aaccttgac gcccttgagc gcatagcttt accagggtct cctaggtccc gcctcttgcc 1140
 cttttacggc acaggttcca agccaggctc tccccaccgc cttaaagagg ctacaccttc 1200
 ttttctttt tgtggaaggg gctccttcag gggctatggg cgatgcagtg cggcagggtt 1260
 agacttacgt gtaaggggat ttttaaaacc cgctcctccc acccgcccc gccacctact 1320

cgctccgccg ccgcctacag gtggagaagt caccagtggg gaggaacggc agcggaagct 1380
 tccaaggcca actcctaccc ctgaaattct tcaggaaggg aaccttcgcc gctggggggc 1440
 tctttggcct ggaatcgatg cgcccagctg cggctcggaa gccagcgcct ctggccccgt 1500
 ctggactcat ctgcaagggc tctggcctcg ccccgacccc ccacctttcg ggactgaccg 1560
 aaccaagtct gagttgggct ggagaggcta gactggaggc aggggtggcag agttccaacg 1620
 acaggctcgc agtgccgcga atggcaaagt. gggccacaac cccagatcag gaccagaga 1680
 aactggagtc tctctctggg cctcccatct cctccctccc tggcaactac caggttgtgg 1740
 ggtgggaggg agagtgaaaa atcaagaatt tgggagaaag ctgtggggag ggcagggag 1800
 ggatccttct ccccggggaa gcgagaccca gactcccttc tttcctctag ggttccatcc 1860
 cttctctcag tccgtggaag aggccacagg cgacgcgggc gaggttgga cttttttcca 1920
 gtttccttgg ttgggagacc cgacctctct ctccattatc ccctagggcc cccatctcct 1980
 tctcccttcc ctagtctggc tgaagaacgt ccttaaggaa atccgggctg ctcttcccca 2040
 tctggaagtg gctttcccca catcggctcg taaactgatt atgaaacata cgatgttaat 2100
 tcggagctgc atttcccagc tgggcactct cgcgcgctgg tccccggggc ctgcccccc 2160
 acccctgcc cttccctccc gcgtctgcc cccatcctcc acccccgcg ctggccaccc 2220
 cgctctcttg gcagcctctg gcggcagcgc gctccactcg cctcccgtgc tcctctcgcc 2280
 catggaatta attctggctc cacttggtgc tcggcccagg ttggtgagag gacggagggt 2340
 gccacagcg ggttcttgag tgaattaccc aggagggact gagcacagca ccaactagag 2400
 gggggccagg ggggtgcggga ctcgagcgag caggaaggag gcagcgcctg gcaccagggc 2460

<210>4

<211>585

<212>PROTEIN

<213>HOMO SAPIENS

<400>4

Met Ala Arg Pro Asp Pro Ser Ala Pro Pro Ser Leu Leu Leu Leu
 5 10 15
 Leu Leu Ala Gln Leu Val Gly Arg Ala Ala Ala Ser Lys Ala
 20 25 30
 Pro Val Cys Gln Glu Ile Thr Val Pro Met Cys Arg Gly Ile Gly

35	40	45
Tyr Asn Leu Thr His Met Pro Asn Gln Phe Asn His Asp Thr Gln		
50	55	60
Asp Glu Ala Gly Leu Glu Val His Gln Phe Trp Pro Leu Val Glu		
65	70	75
Ile Gln Cys Ser Pro Asp Leu Arg Phe Phe Leu Cys Thr Met Tyr		
80	85	90
Thr Pro Ile Cys Leu Pro Asp Tyr His Lys Pro Leu Pro Pro Cys		
95	100	105
Arg Ser Val Cys Glu Arg Ala Lys Ala Gly Cys Ser Pro Leu Met		
110	115	120
Arg Gln Tyr Gly Phe Ala Trp Pro Glu Arg Met Ser Cys Asp Arg		
125	130	135
Leu Pro Val Leu Gly Arg Asp Ala Glu Val Leu Cys Met Asp Tyr		
140	145	150
Asn Arg Ser Glu Ala Thr Thr Ala Pro Pro Arg Pro Phe Pro Ala		
155	160	165
Lys Pro Thr Leu Pro Gly Pro Pro Gly Ala Pro Ala Ser Gly Gly		
170	175	180
Glu Cys Pro Ala Gly Gly Pro Phe Val Cys Lys Cys Arg Glu Pro		
185	190	195
Phe Val Pro Ile Leu Lys Glu Ser His Pro Leu Tyr Asn Lys Val		
200	205	210
Arg Thr Gly Gln Val Pro Asn Cys Ala Val Pro Cys Tyr Gln Pro		
215	220	225
Ser Phe Ser Ala Asp Glu Arg Thr Phe Ala Thr Phe Trp Ile Gly		
230	235	240
Leu Trp Ser Val Leu Cys Phe Ile Ser Thr Ser Thr Thr Val Ala		
245	250	255

Thr Phe Leu Ile Asp Met Asp Thr Phe Arg Tyr Pro Glu Arg Pro		
260	265	270
Ile Ile Phe Leu Ser Ala Cys Tyr Leu Cys Val Ser Leu Gly Phe		
275	280	285
Leu Val Arg Leu Val Val Gly His Ala Ser Val Ala Cys Ser Arg		
290	295	300
Glu His Asn His Ile His Tyr Glu Thr Thr Gly Pro Ala Leu Cys		
305	310	315
Thr Ile Val Phe Leu Leu Val Tyr Phe Phe Gly Met Ala Ser Ser		
320	325	330
Ile Trp Trp Val Ile Leu Ser Leu Thr Trp Phe Leu Ala Ala Ala		
335	340	345
Met Lys Trp Gly Asn Glu Ala Ile Ala Gly Tyr Gly Gln Tyr Phe		
350	355	360
His Leu Ala Ala Trp Leu Ile Pro Ser Val Lys Ser Ile Thr Ala		
365	370	375
Leu Ala Leu Ser Ser Val Asp Gly Asp Pro Val Ala Gly Ile Cys		
380	385	390
Tyr Val Gly Asn Gln Asn Leu Asn Ser Leu Arg Arg Phe Val Leu		
395	400	405
Gly Pro Leu Val Leu Tyr Leu Leu Val Gly Thr Leu Phe Leu Leu		
410	415	420
Ala Gly Phe Val Ser Leu Phe Arg Ile Arg Ser Val Ile Lys Gln		
425	430	435
Gly Gly Thr Lys Thr Asp Lys Leu Glu Lys Leu Met Ile Arg Ile		
440	445	450
Gly Ile Phe Thr Leu Leu Tyr Thr Val Pro Ala Ser Ile Val Val		
455	460	465
Ala Cys Tyr Leu Tyr Glu Gln His Tyr Arg Glu Ser Trp Glu Ala		

470	475	480
Ala Leu Thr Cys Ala Cys Pro Gly His Asp Thr Gly Gln Pro Arg		
485	490	495
Ala Lys Pro Glu Tyr Trp Val Leu Met Leu Lys Tyr Phe Met Cys		
500	505	510
Leu Val Val Gly Ile Thr Ser Gly Val Trp Ile Trp Ser Gly Lys		
515	520	525
Thr Val Glu Ser Trp Arg Arg Phe Thr Ser Arg Cys Cys Cys Arg		
530	535	540
Pro Arg Arg Gly His Lys Ser Gly Gly Ala Met Ala Ala Gly Asp		
545	550	555
Tyr Pro Glu Ala Ser Ala Ala Leu Thr Gly Arg Thr Gly Pro Pro		
560	565	570
Gly Pro Ala Ala Thr Tyr His Lys Gln Val Ser Leu Ser His Val		
575	580	585

<210>5

<211>2334

<212>DNA

<213>HOMO SAPIENS

<400>5

accagggac ggaggacca ggctggcttg gggactgtct gctcttctcg gcgggagccg	60
tggagagtcc tttccctgga atccgagccc taaccgtctc tccccagccc tatccggcga	120
ggagcggagc gctgccagcg gaggcagcgc cttcccgaag cagtttatct ttggacggtt	180
ttctttaaag gaaaaacgaa ccaacaggtt gccagccccg gcgccacaca cgagacgccg	240
gagggagaag ccccggcccg gattcctctg cctgtgtgcg tccctcgcgg gctgctggag	300
gcgaggggag ggagggggcg atggctcggc ctgaccatc cgcgccgcc tgcgtgtgc	360
tgctgctcct ggcgagctg gtgggccggg cggccgccgc gtccaaggcc ccggtgtgcc	420
aggaaatcac ggtgcccattg tgccgaggca tcggctacaa cctgacgcac atgcccacc	480
agttcaacca cgacacgcag gacgaggcgg gcctggaggt gcaccagttc tggccgctgg	540

tggagatcca atgctcgccg gacctgcgct tcttctatg cactatgtac acgcccattct 600
 gtctgcccga ctaccacaag ccgctgccgc cctgccgctc ggtgtgagag cgcgccaagg 660
 ccggctgctc gccgctgatg cgccagtagc gcttcgcctg gcccgagcgc atgagctgcg 720
 accgcctccc ggtgctgggc cgcgacgccg aggtcctctg catggattac aaccgcagcg 780
 aggccaccac ggcgcccccc aggcctttcc cagccaagcc cacccttcca ggcccgccag 840
 gggcgccggc ctcggggggc gaatgccccg ctggggggccc gttcgtgtgc aagtgtcgcg 900
 agcccttcgt gccattctg aaggagtcac acccgctcta caacaagggtg cggacgggcc 960
 aggtgcccac ctgcgcggta ccttgctacc agccgtcctt cagtgccgac gagcgcacgt 1020
 tcgccacctt ctggataggc ctgtggtcgg tgctgtgctt catctccacg tccaccacag 1080
 tggccacctt cctcatcgac atggacacgt tccgctatcc tgagcgcccc atcatcttcc 1140
 tgtcagcctg ctacctgtgc gtgtcgctgg gcttcttggg gcgtctgggc gtgggccatg 1200
 ccagcgtggc ctgcagccgc gagcacaacc acatccacta cgagaccacg ggccctgcac 1260
 tgtgcaccat cgtcttctc ctggtctact tcttcggcat ggccagctcc atctgggtggg 1320
 tcatcctgtc gctcacctgg ttcctggccg ccgcgatgaa gtggggcaac gaggccatcg 1380
 cgggctacgg ccagtacttc cacctggctg cgtggctcat cccagcgtc aagtccatca 1440
 cggcactggc gctgagctcc gtggacgggg acccagtggc cggcatctgc tacgtgggca 1500
 accagaacct gaactcgctg cggcgcttcg tgctgggccc gctggtgtc tacctgctgg 1560
 tgggcacgct cttcctgctg gcgggcttcg tgctgctctt ccgcatccgc agcgtcatca 1620
 agcagggcgg caccaagacg gacaagctgg agaagctcat gatccgcacg ggcatcttca 1680
 cgctgctcta cacgggtccc gccagcattg tggtggcctg ctacctgtac gagcagcact 1740
 accgcgagag ctgggaggcg gcgctcacct gcgcctgccc gggccacgac accggccagc 1800
 cgcgcgcca gcccagtagc tgggtgctca tgctcaagta cttcatgtgc ctggtggtgg 1860
 gcatcacgtc gggcgtctgg atctggtcgg gcaagacggt ggagtcgtgg cggcgcttca 1920
 ccagccgctg ctgctgccgc ccgcggcgcg gccacaagag cggggcgccc atggccgcag 1980
 gggactaccc cgaggcgagc gccgcgtca caggcaggac cgggcccgcg ggccccgccg 2040
 ccacctacca caagcaggtg tccctgtcgc acgtgtagga ggctgccgcc gagggactcg 2100
 gccggagagc tgaggggagg ggggcgtttt gtttggtagt tttgccaagg tcaacttccg 2160
 ttaccttcat ggtgctgttg cccctccc cggcgacttg gagagaggga agaggggcgt 2220
 tttcgaggaa gaacctgtcc caggctcttct ccaaggggcc cagctcacgt gtattctatt 2280

ttgcgtttct tacctgcctt ctttatggga accctctttt taatttatat gtat

2334

<210>6

<211>570

<212>PROTEIN

<213>RATTUS SP.

<400>6

Met Arg Ala Arg Ser Ala Leu Pro Arg Ser Ala Leu Pro Arg Leu

5 10 15

Leu Leu Pro Leu Leu Leu Leu Pro Ala Ala Gly Pro Ala Gln Phe

20 25 30

His Gly Glu Lys Gly Ile Ser Ile Pro Asp His Gly Phe Cys Gln

35 40 45

Pro Ile Ser Ile Pro Leu Cys Thr Asp Ile Ala Tyr Asn Gln Thr

50 55 60

Ile Met Pro Asn Leu Leu Gly His Thr Asn Gln Glu Asp Ala Gly

65 70 75

Leu Glu Val His Gln Phe Tyr Pro Leu Val Lys Val Gln Cys Ser

80 85 90

Pro Glu Leu Arg Phe Phe Leu Cys Ser Met Tyr Ala Pro Val Cys

95 100 105

Thr Val Leu Glu Gln Ala Ile Pro Pro Cys Arg Ser Ile Cys Glu

110 115 120

Arg Ala Arg Gln Gly Cys Glu Ala Leu Met Asn Lys Phe Gly Phe

125 130 135

Gln Trp Pro Glu Arg Leu Arg Cys Glu His Phe Pro Arg His Gly

140 145 150

Ala Glu Gln Ile Cys Val Gly Gln Asn His Ser Glu Asp Gly Thr

155 160 165

Pro Ala Leu Leu Thr Thr Ala Pro Pro Ser Gly Leu Gln Pro Gly

170	175	180
Ala Gly Gly Thr Pro Gly Gly Pro Gly Gly Gly Gly Ala Pro Pro		
185	190	195
Arg Tyr Ala Thr Leu Glu His Pro Phe His Cys Pro Arg Val Leu		
200	205	210
Lys Val Pro Ser Tyr Leu Ser Tyr Lys Phe Leu Gly Glu Arg Asp		
215	220	225
Cys Ala Ala Pro Cys Glu Pro Ala Arg Pro Asp Gly Ser Met Phe		
230	235	240
Phe Ser His His His Thr Arg Phe Ala Arg Leu Trp Ile Leu Thr		
245	250	255
Trp Ser Val Leu Cys Cys Ala Ser Thr Phe Phe Thr Val Thr Thr		
260	265	270
Ser Leu Val Ala Met Gln Arg Phe Arg Tyr Pro Glu Arg Pro Ile		
275	280	285
Ile Phe Leu Ser Gly Cys Tyr Thr Met Val Ser Val Ala Tyr Ile		
290	295	300
Ala Gly Phe Val Leu Gln Glu Arg Val Val Cys Asn Glu Arg Phe		
305	310	315
Ser Glu Asp Gly Tyr Arg Thr Val Gly Gln Gly Thr Lys Lys Glu		
320	325	330
Gly Cys Thr Ile Leu Phe Met Met Leu Tyr Phe Phe Ser Met Ala		
335	340	345
Ser Ser Ile Trp Trp Val Ile Leu Ser Leu Thr Trp Phe Leu Ala		
350	355	360
Ala Gly Met Lys Trp Gly His Ala Ala Ile Glu Ala Asn Ser Gln		
365	370	375
Tyr Phe His Leu Ala Ala Trp Ala Val Pro Ala Val Lys Thr Ile		
380	385	390

Thr Ile Leu Ala Met Gly Gln Ile Asp Gly Asp Leu Leu Ser Gly	395	400	405
Val Cys Phe Val Gly Leu Asn Arg Leu Asp Pro Leu Arg Gly Phe	410	415	420
Val Leu Ala Pro Leu Phe Val Tyr Leu Phe Ile Gly Thr Ser Phe	425	430	435
Leu Leu Ala Gly Phe Val Ser Leu Phe Arg Ile Arg Thr Ile Met	440	445	450
Lys His Asp Gly Thr Lys Thr Glu Pro Leu Glu Arg Leu Met Val	455	460	465
Arg Ile Gly Val Phe Ser Val Leu Tyr Thr Val Pro Ala Thr Ile	470	475	480
Val Ile Ala Cys Tyr Phe Tyr Glu Gln Ala Phe Arg Glu His Trp	485	490	495
Glu Arg Ser Trp Val Ser Gln His Cys Lys Ser Leu Ala Ile Pro	500	505	510
Cys Pro Ala His Tyr Thr Pro Arg Thr Ser Pro Asp Phe Thr Val	515	520	525
Tyr Met Ile Lys Tyr Leu Met Thr Leu Ile Val Gly Ile Thr Ser	530	535	540
Gly Phe Trp Ile Trp Ser Gly Lys Thr Leu His Ser Trp Arg Lys	545	550	555
Phe Tyr Thr Arg Leu Thr Asn Ser Arg His Gly Glu Thr Thr Val	560	565	570

<210>7

<211>1912

<212>DNA

<213>RATTUS SP.

<400>7

aggggaaggc gcgcggtctc tgggttgggg gcgggggctg gggggcgccc aggagccgag 60
 tggggggcgg cggccagcat gcggggccgc agcgccctgc cccgcagcgc cctgccccgc 120
 ctgctgctgc cactgctgct gctgccggct gccggggcgg ctgagttcca cggggagaag 180
 ggcatctcca tcccggaacca cggcttctgc cagcccatct ccatcccgct gtgcacggac 240
 atgcctaca accagaccat catgcccac cttcttgggc acacgaacca agaggacgcg 300
 ggcttggagg tgcatcaatt ctacccgctg gtgaagggtg agtgctcgcc cgagctgcgc 360
 ttcttctgt gctccatgta cgctccgggtg tgcacgggtg tggagcaggc catcccgccg 420
 tgccgctcca tctgcgaacg cgcgcgcca ggctgcgagg cgctcatgaa caagttcggc 480
 ttccagtggc ccgagcgctt ccgctgcgag catttccgc gtcacggcgc ggagcagatc 540
 tgcgtgggccc agaaccactc cgaggacgga actcctgcgc tactcaccac cgcgccaccg 600
 tctgggctgc agcctggcgc tgggtggcacc ccggggcggc ctggcggtgg tggcgcgccc 660
 ccgcgctacg ccactctgga gcaccctttc cactgtcccc gcgtcctcaa ggtgccgtcc 720
 tatctcagct ataagtttct ggggtgagcgc gattgtgccg cgccctgcga gcctgcacgg 780
 cccgacggct ccatgttctt ctgcaccac cacactcgtt ttgcccgtct ctggatcctc 840
 acatggctcg tgctgtgctg cgcttctact ttcttcacgg tcaccacctc tttagtggcc 900
 atgcagcgat tccgctaccc agagcggccc atcatcttc tgtccggttg ctacaccatg 960
 gtgtcagtgg cctacattgc gggcttcgtg ctccaggagc gcgtgggtgtg caacgagcgc 1020
 ttctctgagg acggttatcg cacgggtggg cagggcacta agaaagaagg ctgtactata 1080
 ctcttcatga tgctctactt cttcagtatg gccagctcca tctggtgggt gattctgtcc 1140
 ctcacctggt tcttggcagc cggatgaag tggggccacg cggccatcga ggccaattcg 1200
 cagtacttcc acctggccgc ctgggcggtg ccggccgtca aaaccatcac catcctggcc 1260
 atggggcaga tcgacggcga cctgctgagc ggcggtgtgt tcgtgggcct caacaggctg 1320
 gaccgctgc gaggcttcgt gctggcgccg ctcttcgtgt acctgttcat cggcacatcc 1380
 ttcttctggt cgggcttcgt gtcactcttc cgcatccgca ccatcatgaa gcacgacggc 1440
 accaagacgg agccgctgga gaggtcatg gtgcgtatcg gcgtcttctc cgtgctctac 1500
 accgtaccgg ccaccatcgt catgcctgc tacttctatg agcaggcctt ccgcgagcac 1560
 tgggagcgct cgtgggtaag ccagcactgc aagagcctag ccatcccctg cccggccccc 1620
 tacacgccc gcacgtcgcc cgacttcaca gtctacatga tcaaatacct catgacgctc 1680
 atcgtgggca tcacgtcggg cttctggatc tggtcggca agacgctgca ctcgtggagg 1740

aagttctaca cgcgctctcac caacagccgg catggagaga ccaccgtgtg aagcgggtctc 1800
 gctgctgggc gccccctct cccaggtccg gactgcaacc gtgccctcct tcactcggga 1860
 ggggggtgca ccctacggac tcctatttta tttttttaaa taaagaacag tg 1912

<210>8

<211>27

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<400>8

aatgtcttcc aagttcttcc tagtggc 27

<210>9

<211>22

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<400>9

gatgtcggaa ttgatactgg ca 22

<210>10

<211>20

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<400>10

accacagtcc atgccatcac 20

<210>11

<211>20

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<400>11

tccaccaccc tgttgctgta 20

【書類名】 図面

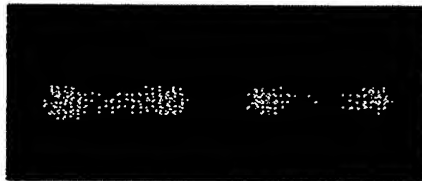
【図 1】

DPC HFC

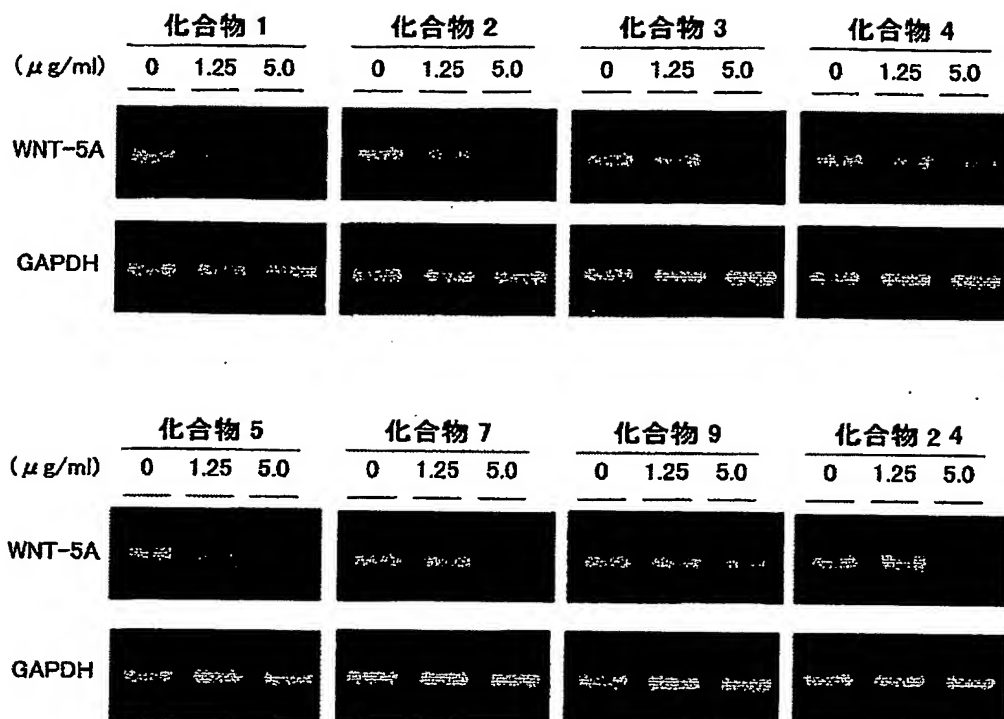
WNT-5A



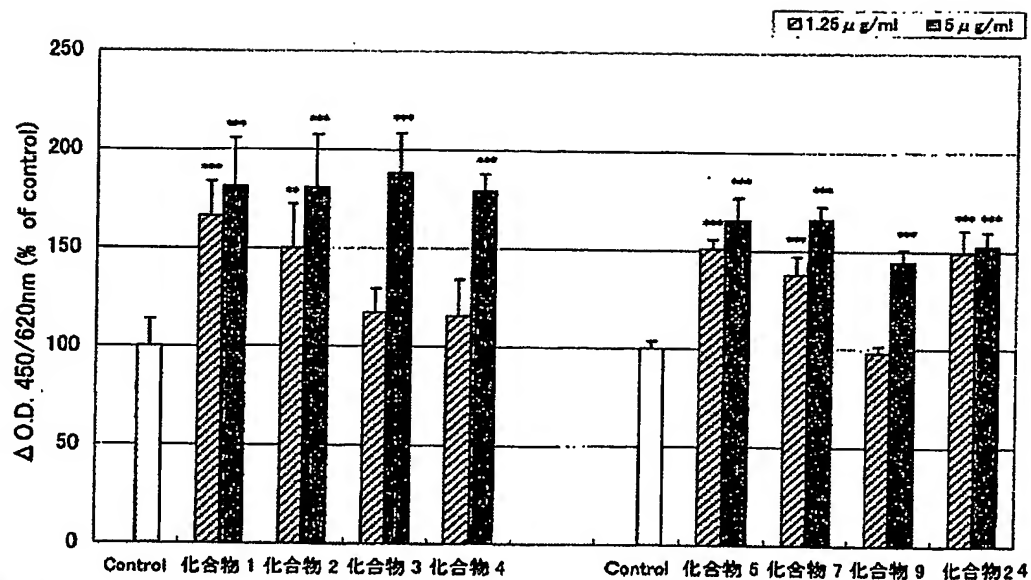
GAPDH



【図 2】



【図 3】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 新規な作用機序による発毛剤／育毛剤を提供する。

【解決手段】 WNT-5A機能を阻害する化合物を有効成分とする発毛剤／育毛剤。

【選択図】 なし。

認定・付加情報

特許出願の番号	特願2002-115529
受付番号	50200563011
書類名	特許願
担当官	第四担当上席 0093
作成日	平成14年 4月18日

<認定情報・付加情報>

【提出日】	平成14年 4月17日
-------	-------------

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000002819]

1. 変更年月日	1990年 8月22日
[変更理由]	新規登録
住 所	東京都豊島区高田3丁目24番1号
氏 名	大正製薬株式会社

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.